

**Vergleich von *Spa*-Typisierung und
Pulsfeld-Gelelektrophorese an MRSA-Isolaten des
Universitätsklinikums Jena im Jahr 2004**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Christian Andreas

geboren am 28. Februar 1982 in Leipzig

Gutachter

1. Univ.-Prof. Dr. med. Eberhard Straube

2. Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf-Albert Venbrocks

3. Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang König

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08. Juni 2009

„Nur wer nicht sucht, ist vor Irrtum sicher.“

-Albert Einstein-

Für meine Familie

Abkürzungsverzeichnis

Eigene Abkürzungen

α	Signifikanzniveau
abs.	absolut
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BD	Bandendifferenz
BURP	„Based Upon Repeat Pattern“ (basierend auf dem Repeatmuster), Algorithmus zur Gruppierung verwandter Genotypen
CC	„Clonal Complex“ (klonaler Komplex nach MLST)
CHEF	„Contoured Clamped Homogeneous Electric Field“ (Pulsfeldtechnik, die durch multiple Elektroden ein homogenes elektrisches Feld gewährleistet)
CI	chirurgische Kliniken einschließlich der Klinik für Intensivmedizin
cMRSA	„community acquired“ (ambulant erworbener) MRSA
DEPC Wasser	Diethylpyrocarbonat 1 mg, destilliertes Wasser 999 ml
DI	Diversitätsindex
DK	Dice-Koeffizient
DNA	„Deoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Einheit
eBURST	„Enhanced Based Upon Related Sequence Types“ (verstärkt basierend auf verwandten Sequenztypen), Algorithmus zur Gruppierung verwandter Genotypen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Erstisolat(ion)
EMRSA	Epidemischer MRSA
fw	„forward“ (vorwärts)
GENARS	„German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance“ (Deutsches Netzwerk zur antimikrobiellen Resistenzüberwachung)
IgG	Immunglobulin G
IM	Klinik für Innere Medizin
ITS	Intensivstation(en)
KI	Konfidenzintervall
KJ	Klinikum Jena
KS	Kontrollstamm
Ladder	Gemisch von DNA-Molekülen verschiedener Länge
LL	Lambda-Ladder (DNA-Größenstandard)
M	Mitarbeiterisolat(e)
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MLST	Multilocus-Sequenztypisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Probandenanzahl
NI	Neuinfektion(en)
NRZ	Nationales Referenzzentrum für die Surveillance nosokomialer Infektionen
NCTC	„National Collection of Type Cultures“ (nationale Sammlung von Typisierungskulturen in den USA)
ONG	Oligonukleotidgemisch

OR	Odds-Ratio
ORSA	Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (Synonym für MRSA)
p	p-Wert
PBP	penicillinbindendes Protein
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PFN	Pulsfeldnummer
PN	Patientennummer
PT	Pulsfeldtyp
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
R	Repeat(s)
REK	Rudolf-Elle-Krankenhaus
rv	„reverse“ (rückwärts)
S	Signalsequenz
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SL	<i>Spa</i> -Ladder, selbstangefertigte DNA-Molekülmischung (vgl. 4.3)
<i>Spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> -Protein A
<i>Spa</i> -CC	„ <i>Spa</i> -Clonal Complex“ (klonaler <i>Spa</i> -Komplex nach BURP)
ST	Sequenztyp (nach MLST), im Einzelfall auch <i>Spa</i> -Typ
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVöD	Tarifvertrag öffentlicher Dienst
UPGMA	„Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean“ (ungewichtete Paargruppierungsmethode mit arithmetischem Mittelwert)
UV	Ultraviolettstrahlung
x	„fach“ (z.B. 10x = 10fach)
Xc	Zellwandbefestigungssequenz der X-Region (des <i>Spa</i> -Gens)
Xr	polymorphe X-Region (des <i>Spa</i> -Gens)

Einheiten und Zahlenwerte

°	Grad	m	nachgestellt Meter, vorangestellt milli (10^{-3})
°C	Grad Celsius	M	nachgestellt molar (Mol pro Liter)
μ	mikro (10^{-6})		vorangestellt mega (10^6)
∞	unendlich	min	Minute
A	Ampere	n	nano (10^{-9})
b	Base(n)	p	piko (10^{-12})
bp	Basenpaare	pH	pH-Wert (potentia Hydrogenii)
c	zenti (10^{-2})	s	Sekunde
d	Tag	u	„enzyme unit“ (Enzymeinheit); diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min ein Mikromol Substrat umsetzt
Da	Dalton	U	Volt
g	Gramm, Erdbeschleunigung		
h	Stunde		
J	Jahr(e)		
k	kilo (10^3)		
l	Liter		

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Eigene Abkürzungen.....	IV
Einheiten und Zahlenwerte.....	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Biologie von <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.2 Klinische Bedeutung von <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.3 Epidemiologie der Methicillinresistenz von <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.4 Ausbreitung und Übertragung von MRSA.....	9
2.5 Vermeidungsstrategien für Infektionen mit MRSA	10
2.6 Verfahren zur Typisierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3 Zielsetzung der Studie	16
4 Material	17
4.1 Untersuchungsmaterial.....	17
4.2 Geräte.....	17
4.3 Chemikalien.....	18
4.4 Kits	19
4.5 Nährmedien.....	20
4.6 Zubehör.....	20
5 Methoden	21
5.1 Isolierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	21
5.2 <i>Spa</i> -Typisierung	21
5.2.1 DNA-Extraktion.....	21
5.2.2 PCR der X-Region.....	22
5.2.3 Kontrolle der PCR im Agarosegel	23
5.2.4 Identifizierung nicht amplifizierbarer Proben	23
5.2.5 Aufreinigung der Amplifikate	24

5.2.6	Sequenz-PCR.....	24
5.2.7	Aufreinigung der Sequenz-PCR-Amplifikate	25
5.2.8	Sequenzanalyse im MEGAbace Sequenzer 500	25
5.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	27
5.3.1	Stammkultivierung und DNA-Präparation.....	27
5.3.2	Restriktionsverdau	27
5.3.3	Gelelektrophorese	28
5.3.4	Färben und Fotografieren des Gels	28
5.3.5	Auswertung des Gels	28
5.4	Statistische Auswertung.....	29
6	Ergebnisse	30
6.1	Probenzusammensetzung	30
6.2	Ergebnisse der <i>Spa</i> -Typisierung	30
6.2.1	Gesamtverteilung der <i>Spa</i> -Typen	31
6.2.2	MRSA-Anteil und <i>Spa</i> -Typenverteilung einzelner Fachgebiete.....	32
6.2.3	Zusammenhang zwischen <i>Spa</i> -Typ und Entnahmestelle	34
6.2.4	Änderung der <i>Spa</i> -Typenverteilung in Jena im Jahresverlauf 2004.....	35
6.2.5	MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus	36
6.2.6	Ausbruchsanalyse am Rudolf-Elle-Krankenhaus.....	39
6.3	Ergebnisse der Pulsfeld-Gelelektrophorese	41
6.3.1	Manuelle Auswertung der Pulsfeldtypen.....	42
6.3.2	Digitale Auswertung der Pulsfeldtypen.....	42
6.4	Vergleich von Pulsfeld-Gelelektrophorese und <i>Spa</i> -Typisierung.....	44
6.4.1	Diskriminationsvermögen und Ausbruchsanalyse.....	44
6.4.2	Arbeitsaufwand und Kosten der Typisierungsverfahren.....	45
7	Diskussion	47
7.1	Probenzusammensetzung	47
7.2	<i>Spa</i> -Typisierung	48
7.2.1	Verteilung der <i>Spa</i> -Typen.....	49
7.2.2	MRSA-Anteil verschiedener Fachgebiete	51
7.2.3	Zusammenhang zwischen <i>Spa</i> -Typ und Entnahmestelle	54

7.2.4	Änderung der <i>Spa</i> -Typenverteilung in Jena im Jahresverlauf 2004.....	55
7.2.5	Ausbruchsanalyse.....	56
7.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	59
7.3.1	Manuelle Ermittlung der Pulsfeldtypen.....	59
7.3.2	Digitale Auswertung der Pulsfeldtypen.....	59
7.4	Vergleich von <i>Spa</i> -Typisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	61
7.4.1	Typisierungsergebnisse im Rahmen des Ausbruchsgeschehens.....	61
7.4.2	Diskriminationsvermögen, Praktikabilität und Kosten.....	64
8	Schlussfolgerungen	68
9	Literaturverzeichnis	70
10	Anhang	89
10.1	Gesamtübersicht der MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus.....	89
10.2	Gesamtübersicht der zu typisierenden Isolate	92
	Ehrenwörtliche Erklärung	95
	Danksagung	96
	Lebenslauf	97

1 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist nicht nur der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen, sondern auch einer der virulentesten, unabhängig von seiner Antibiotikaresistenz. Der Nachweis Methicillin-resistenter *Staphylococci aurei* im Krankenhaus ist dabei meist mit aufwändigen Hygienemaßnahmen für Patienten und Personal verbunden, und resultiert zudem in verlängerter Liegedauer, zusätzlichen medizinischen Maßnahmen, erhöhten Kosten sowie in tödlichen Infektionen. Voraussetzung für die frühzeitige Aufdeckung möglicher Ausbrüche und Übertragungswege ist hierbei eine zeitnahe Erfassung und klonale Typisierung der Erreger, welche durch genotypische Verfahren besonders präzise realisierbar ist. Den „Goldstandard“ unter diesen Methoden bildete lange Zeit die Pulsfeld-Gelelektrophorese, welche auf der Trennung genomischer DNA-Fragmente im Agarosegel basiert. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit der *Spa*-Sequenzanalyse gegenübergestellt, welche eine vergleichende Single-Lokus-Sequenztypisierung von 21-30bp langen Tandemrepeats der polymorphen X-Region des *Staphylococcus aureus*-Proteins A darstellt. Ziel war hierbei nicht nur eine Evaluation beider Verfahren an Hand von Diskriminationsvermögen, Anwender- und Interpretationsfreundlichkeit sowie nicht zuletzt Kostenaufwand, sondern auch eine komplette Erfassung der MRSA-Situation am Universitätsklinikum Jena einschließlich des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg im Jahr 2004.

Hierfür wurden sämtliche MRSA-Isolate beider Einrichtungen im Untersuchungszeitraum der *Spa*-Typisierung zugeführt. Zusätzlich erfolgte auf Grundlage der Pulsfeld-Gelelektrophorese eine Typisierung aller Proben des Rudolf-Elle-Krankenhauses. Insgesamt konnten 214 MRSA-Stämme zur weiteren Analyse gewonnen werden, unter denen sich 50 Mehrfachisolate sowie jeweils 4 Personal- und Hygieneproben befanden. Fünf der Proben ergaben keine verwertbaren *Spa*-PCR-Amplifikate, und wurden nach Zuordnung zur Spezies *Staphylococcus haemolyticus* sowie *Staphylococcus saprophyticus* von der Studie ausgeschlossen. Die Geschlechtsverteilung der 151 Patienten betrug männlich zu weiblich 62.9% zu 37.1%, wobei das Alter zwischen 18 und 89 Jahren lag (Median 67J, Mittelwert 64.2J). Das Durchschnittsalter der MRSA-Kohorte war gegenüber demjenigen der MSSA-Vergleichsgruppe desselben Zeitraums (N=1437, Median 55J, Mittelwert 48.9J) signifikant erhöht ($p < 0.001$). Zu den häufigsten der 22 gefundenen *Spa*-Typen unter 151 Patienten-erstisolaten zählten Typ t041 (27.2%), Typ t003 (20.5%), Typ t001 (19.2%), Typ t004 (11.3%) und Typ t032 (8.6%). Signifikante Unterschiede in der *Spa*-Typenverteilung ergaben sich weder zwischen den jeweiligen Entnahmestellen, noch zwischen den Fachabteilungen

des Klinikums Jena, wobei im 2. Quartal des Jahres 2004 ein Umzug der chirurgischen und intensivmedizinischen Klinik aus dem Stadtzentrum nach Lobeda-Ost erfolgte. Der MRSA-Anteil betrug am Universitätsklinikum Jena 7.9%. Hierbei waren vordergründig die Klinik für Urologie (15.8%), Intensivmedizin (15.3%) und Chirurgie (11.5%) betroffen. Am Rudolf-Elle-Krankenhaus betrug die MRSA-Rate 27.6%, wobei die Abteilungen für Intensivmedizin (54.5%), Chirurgie (52.2%) und Orthopädie (21.1%) die meisten Nachweise verzeichneten. Grund für diesen vergleichsweise hohen MRSA-Anteil waren maßgeblich mehrere Häufungen (Cluster) des *Spa*-Typs t041, an denen zwischen 2 bis 7 Patienten beteiligt waren. Zudem kann bei diesem Typ von einem endemischen Hospitalkeim ausgegangen werden, welcher durch Kreuzinfektionen möglicherweise in bis zu 13 von 34 Fällen zwischen den Patienten übertragen wurde. Eine konkrete Infektionsquelle war nicht nachweisbar, auch die 4 MRSA-positiven Mitarbeiter waren nicht mit diesem *Spa*-Typ besiedelt. Diese Tatsache unterstreicht die eminente Bedeutung von Händedesinfektionsmaßnahmen als auch von regelmäßigen Untersuchungen des Personals zur Vermeidung von Keimübertragungen sowie die Notwendigkeit eines MRSA-Screenings bei aufzunehmenden Risikopatienten, welches ab Ende des Jahres 2004 in Jena etabliert wurde.

Vergleichende Untersuchungen zwischen PFGE und *Spa*-Typisierung im Rahmen des Ausbruchsgeschehens ergaben eine Konkordanz beider Verfahren von 89.5%, was einer überzufällig starken, signifikanten Übereinstimmung ($\kappa = 0.769$, $p < 0.001$) entspricht. Das höhere Diskriminationsvermögen besaß hierbei die Pulsfeld-Gelelektrophorese (DI 71.3%), obwohl kein signifikanter Unterschied zur *Spa*-Sequenzanalyse (DI 60.9%) bestand. Dennoch hätte die Pulsfeld-Gelelektrophorese im Gegensatz zur *Spa*-Typisierung für 3 (7.9%) der Patientenisolat die definitive Einordnung in das Infektionsgeschehen ermöglicht, weshalb sie im Einzelfall wohl unverzichtbar bleibt, um richtige Schlussfolgerungen aus den ermittelten Beobachtungen ziehen zu können. Die Ergebnisse der *Spa*-Sequenzanalyse waren etwa 48h vor den Ergebnissen der Pulsfeldauswertung verfügbar. Weitere Vorteile gegenüber der PFGE zeigte die *Spa*-Typisierung zudem in punkto Interpretationsfreundlichkeit, Datenverwaltung und -analyse sowie bezüglich des Kostenfaktors. Sie erscheint daher gerade zur dauerhaften Überwachung der MRSA-Situation am Klinikum Jena besonders geeignet. Auf Grund der elektronischen Verfügbarkeit sowie der einheitlichen Nomenklatur der Daten eröffnet sie zudem neue Möglichkeiten für weitere, vergleichende Studien der MRSA-Epidemiologie, zumal sich mehr und mehr Laboratorien am Aufbau eines internationalen MRSA-Typisierungsnetzwerkes auf Grundlage der *Spa*-Sequenzanalyse beteiligen.

2 Einleitung

Die Fähigkeit zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz ist so alt wie die Bakterien selbst. Mit der Einführung des von Sir Alexander Fleming 1928 entdeckten Penicillins in den Krankenhausalltag der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts gipfelte dieser Prozess in einem bis heute andauernden Wettlauf zwischen Mensch und Natur: Die Entwicklung verschiedenster Antibiotika einerseits und, als Folge darauf, das Auftreten neuer, resistenter Bakterienstämme andererseits. Durch den kombinierten und nicht zuletzt unkontrollierten Einsatz solcher Medikamente kam es zunehmend zur Herausbildung von multiresistenten Keimen. Obgleich diesen im gesunden Organismus oftmals eine untergeordnete Krankheitsbedeutung zukommt, so stellen sie doch im klinischen Alltag, insbesondere aber im intensivmedizinischen Sektor, eine große Gefahr da. Zu einem der wichtigsten und zunehmend an Bedeutung gewinnenden Vertreter solcher potentiell multiresistenten Bakterienstämme zählt *Staphylococcus aureus*, welcher in dieser Arbeit eingehend betrachtet werden soll.

2.1 Biologie von *Staphylococcus aureus*

Bereits aus den Jahren 1871/ 72 liegen Berichte über den Nachweis von rundlichen, also kokkoiden Elementen in Abszessen, im Eiter sowie im Blut von pyämischen Patienten vor. Auf Grund der traubenförmigen Anordnung dieser Keime (Abb. 1) prägte der schottische Arzt Sir Alexander Ogston 1880 den Begriff *Staphylococcus* (von griech. *staphyle* = Traube) und zeigte dessen klinische Bedeutung als Eitererreger auf (Ogston 1882).

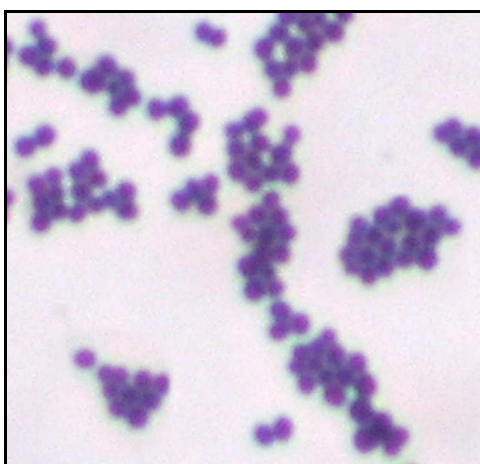


Abb. 1: Lichtmikroskopische Gramfärbung einer Reinkultur von *S. aureus*.

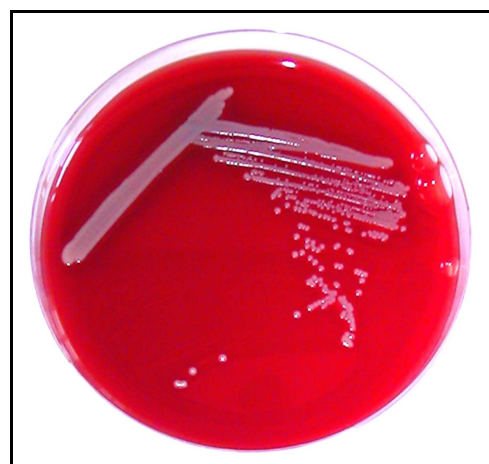


Abb. 2: Wachstum von *S. aureus* auf Schafblutagar nach 24h Bebrütung bei 37°C mit angedeuteter Hämolyse um die Kolonien.

Mikroskopisch erscheint dieses Mitglied der Familie *Staphylococcaceae* als grampositives, nicht Sporen bildendes Kugelbakterium von etwa 1µm Durchmesser, welches auf Grund seiner Unbeweglichkeit dichte Haufen bildet (Bannerman und Peacock 2007, Catalogue of life 2007, Abb. 1). Es lässt sich ohne größere Schwierigkeiten auf vielen künstlichen Nährböden anzüchten und bildet runde, glänzende Kolonien von 1-2mm Durchmesser, die häufig von einem Hämolysehof umgeben sind (Abb. 2). Deren Pigmentierung diente lange Zeit als Klassifizierungsmerkmal der verschiedenen Arten des Genus *Staphylococcus*, welcher mittlerweile mehr als 40 Spezies und Subspezies umfasst (Kwok und Chow 2003). Zur Abgrenzung von *Staphylococcus aureus* gegenüber anderen Spezies werden neben dem Koagulasenachweis unter anderem das typische, schwachgelbe Wachstum auf bluthaltigen Nährmedien (Abb. 2) sowie das Vorhandensein des Clumpingfaktors und der hitzestabilen Nuklease herangezogen (Bannerman und Peacock 2007). Die Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen wie UV-Strahlung, Austrocknung und hohen Temperaturen ist bei *Staphylococcus aureus* relativ hoch und macht das Bakterium zu einem der widerstandsfähigsten humanpathogenen Keime überhaupt (Clements und Foster 1999). Auf klinischen Materialien wie Textilien und Plastikartikeln können die Erreger Tage bis Monate überdauern (Neely und Maley 2000). Diese hohe Tenazität, oder auch „Zähigkeit“, ist ein Grund für die rasche Verbreitung von *Staphylococcus aureus* im Krankenhaus (Hahn et al. 2005).

2.2 Klinische Bedeutung von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist nicht nur der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen, sondern auch einer der gefürchtetsten überhaupt (Emori und Gaynes 1993, Herwaldt 2003). Dies liegt einerseits am großen Spektrum der durch diesen Keim verursachten Erkrankungen, andererseits an dessen Tenazität und Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen (Waldvogel 2000). Als Kommensale der physiologischen Körperflora ist der Erreger bei Mensch und Tieren weit verbreitet (Kloos 1991). Bei etwa 20% der Bevölkerung kolonisiert er dauerhaft, bei rund 60% intermittierend die Haut, insbesondere im Bereich des Nasenvorhofs und des Perineums, seltener das Kolon, Rektum und die Vagina (Archer 1998, Foster 2004). Essentiell für die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* ist eine Vielzahl zellwandständiger und sezernierter Proteine, die den Verlauf und die Schwere einer Infektion mitbestimmen (Dinges et al. 2000, Frees et al. 2005). Das Eindringen in den Wirtsorganismus wird dabei durch lokale und systemische Faktoren beeinflusst. Neben intravasalen Elementen (Katheter, Herzschrittmacher, Gefäßprothesen), Trachealkanülen und Fremdkörperimplantaten begünstigen auch Grundleiden wie rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus oder Krebs

eine Staphylokokkeninfektion (Bergmans et al. 1996, Geipel und Hermann 2004, Gandelman et al. 2007, Jacobsson et al. 2007).

Die durch *Staphylococcus aureus* verursachten Erkrankungen lassen sich in lokalisierte oder generalisierte pyogene und invasive Infektionen sowie durch Toxine vermittelte Erkrankungen gliedern (RKI 2007a, Tab. 1). Bei den invasiven Prozessen kommt es, bedingt durch die Gesamtaktivität von Pathogenitätsfaktoren der jeweiligen Bakteriengruppe, zur progredienten Schädigung des umliegenden Gewebes. Die Schwere der Erkrankung hängt vom Infektionsort, der Abwehrlage des Patienten sowie der Virulenz des Infektionsstammes ab. Im Gegensatz dazu kommt bei den Toxikosen einem bestimmten Toxin die entscheidende pathogenetische Bedeutung zu, welches entweder am Infektionsherd oder aber außerhalb des Patienten (Lebensmittel) gebildet werden kann (Peters und Pulverer 2001).

Tab. 1: Auswahl von Erkrankungen, die häufig durch *Staphylococcus aureus* verursacht werden (modifiziert nach Hahn et al. 2005, Bannerman und Peacock 2007). Bemerkung: Fett markiert sind jene Erkrankungen, bei denen *Staphylococcus aureus* der einzige oder wichtigste ätiologische Faktor ist.

<u>Invasive Erkrankungen</u>		<u>Toxikosen</u>
Lokale Infektionen der Haut, Schleimhäute und Weichteile	Tiefe und generalisierte Prozesse	
<ul style="list-style-type: none"> • Abszess, Furunkel, Karbunkel, Zellulitis • Pyodermie, Impetigo contagiosa • Postoperative und posttraumatische Wundinfektionen • Lokale Infektionen der Hautanhangsorgane (Mastitis puerperalis, eitrige Parotitis, Dakryozystitis, Hordeolum) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bakteriämie, Sepsis • Endokarditis • Osteomyelitis • Empyeme und Organabszesse • Fremdkörperinfektion • Pyomyositis • Nekrotisierende und Beatmungspneumonie, Lungenabszess, Pharyngitis • Meningitis • Septische Arthritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom (SSSS) einschließlich Pemphigus neonatorum • Toxic-Shock-Syndrom (TSS) • Staphylogene Nahrungsmittelvergiftung

2.3 Epidemiologie der Methicillinresistenz von *Staphylococcus aureus*

Bald nach der Einführung der ersten Antibiotika in den Krankenhausalltag der 50er Jahre wurde klar, dass Mikroorganismen effektiv auf den Einsatz solcher Substanzen reagieren können (Kresken und Hafner 1999). Staphylokokken stehen dabei gleichermaßen für den Beginn der Penicillinära als auch der Resistenzproblematik. Zu den bekanntesten Resistenzmechanismen, die sich diese Erreger im Lauf der Jahre aneigneten, gehört neben der Penicillinresistenz die zusätzliche Resistenz gegen β -Lactamase-feste Penicilline, die so

genannte Methicillinresistenz (Janata 2005, Tab. 2). Obwohl Methicillin heute nicht mehr gebräuchlich ist, sondern durch andere Substanzen wie Oxacillin ersetzt wurde, hat sich der Terminus Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) als Beschreibung der Stämme erhalten, die resistent gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme sind (Hornberg et al. 2006).

Tab. 2: Chronologie der *Staphylococcus aureus*-Resistenzen gegen diverse Substanzgruppen (aus Janata 2005).

Jahr	Resistenz gegen				
1944	Penicillin G	1958	Novobiocin	1987	Rifampicin
1951	Streptomycin	1961	Methicillin	2001	Linezolid
1952	Tetracycline	1962	Pristinamycin	2002	Vancomycin
1954	Erythromycin	1981	Trimethoprim		
1956	Chloramphenicol	1985	Quinolone		

MRSA-Stämme wurden bereits kurz nach der klinischen Einführung des Methicillins im Jahre 1959 in Großbritannien isoliert (Jevons 1961). Grund hierfür war der Erwerb des *mecA*-Gens bei klonalen Gruppen von *Staphylococcus aureus*, welches primär für deren Methicillinresistenz verantwortlich ist (Song et al. 1987). Die Funktion liegt in der Kodierung eines induzierbaren, 78kDa großen penicillinbindenden Proteins 2A (PBP 2A oder PBP 2', Hartman und Tomasz 1984), welches Peptidketten der bakteriellen Zellwand vernetzt und somit für das Zellwachstum essentiell ist (Ghuysen 1994). Die Affinität des PBP 2A gegenüber β -Lactamen ist geringer als die der PBP's 1, 2, 3 und 4, welche sich bei allen Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen finden (Georgopapadakou und Liu 1980), wodurch die Zellwandsynthese auch noch bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums aufrechterhalten werden kann (de Jong und Tomasz 1993). Wahrscheinlich wurde es von anderen Bakterien durch genetische Austauschmechanismen erworben, zu denen Transformation, Transduktion sowie Konjugation zählen (horizontaler Gentransfer). Obwohl zunächst angenommen wurde, dass eine solche Akquirierung des *mecA*-Gens durch *Staphylococcus aureus* nur einmal stattgefunden hat (Kreiwirth et al. 1993), ist man mittlerweile der Ansicht, dass es mehrfach zu einem horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen MRSA-Linien kam (Musser und Kapur 1992, Ito et al. 1999, Robinson und Enright 2003). Einige solcher primär endemischen Stämme sind besonders gut an die Bedingungen im Krankenhaus angepasst, und haben sich zwischen Kliniken eines Landes oder international ausgebreitet (epidemische MRSA, EMRSA, Enright et al. 2002). So kam es etwa im Laufe der 70er Jahre zu weltweiten Ausbrüchen von MRSA-Infektionen, die zumeist

auf epidemische, klonale Stämme zurückgingen, welche zwischen den Krankenhäusern übertragen wurden (Musser und Kapur 1992).

Blieb der prozentuale Anteil antibiotikaresistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme über lange Zeit relativ konstant, so zeigt sich seit Beginn der 90er Jahre weltweit ein deutlicher Zuwachs von Oxacillin- und insbesondere Multiresistenz (Resistenz gegenüber >2 antibakteriellen Substanzgruppen, Kresken und Hafner 1999, Tenover 2006), die bei *Staphylococcus aureus* und anderen grampositiven Bakterien mittlerweile zur Norm geworden ist (Lowy 2003, Abb. 4). In einigen südeuropäischen Ländern (Griechenland, Italien, Portugal) liegt der Anteil Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Isolate an einzelnen Kliniken mittlerweile über 50%. Gleichzeitig ist der Resistenzzuwachs in Deutschland seit 1990 (Abb. 3) der höchste im europäischen Vergleich (Tiemersma et al. 2004). Das vermehrte Auftreten multiresistenter Bakterien geht dabei mit einem gestiegenen Antibiotikaverbrauch einher. Dies führt zwangsläufig zu einem erhöhten Selektionsdruck und damit zur weiteren Zunahme resistenter Stämme (Kresken et al. 1999).

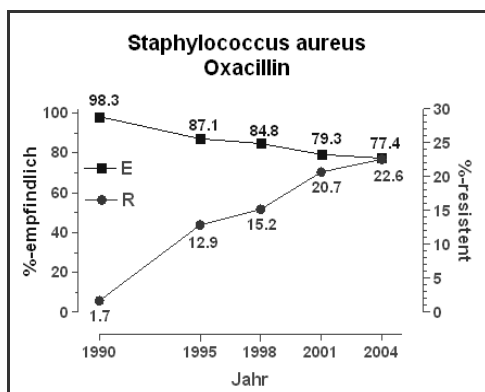


Abb. 3: Anteil der Oxacillinresistenz (= R) unter *S. aureus*-Isolaten in Deutschland von 1990 bis 2004. E = Empfindliche Stämme (nach PEG für Chemotherapie 2007).

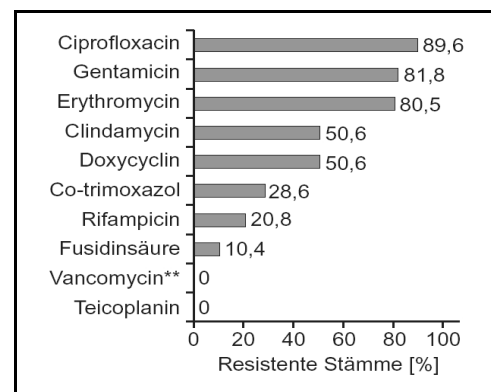


Abb. 4: Häufigkeit von Parallelresistenzen bei 77 Oxacillin-resistenten* *S. aureus* aus der PEG-Studie von 1995 (*MHK >6 mg/l im Oxacillin-Screening-Test, aus Kresken et al. 1999).

Der Inzidenzanstieg multiresistenter Keime ist jedoch nicht nur auf die vermehrte und häufig inadäquate Gabe von Antibiotika zurückzuführen, sondern auch auf die Zunahme multimorbider und immunsupprimierter Patienten, die steigende Rate intensivmedizinischer Maßnahmen und Fremdkörperimplantationen, Fehler oder Inkonsequenz im Hygieneregime sowie nicht zuletzt die mangelnde Information der Nachfolgeeinrichtung bei Verlegung von MRSA-kolonisierten oder infizierten Patienten (RKI 2007a). Bei Auftreten von schwerwiegenden Infektionen bis hin zur Sepsis durch MRSA zeigte sich in Untersuchungen im Vergleich zu Fällen von schwerwiegenden Infektionen durch MSSA (Methicillin-sensibler *Staphylococcus*

aureus) zudem eine Verdopplung der Letalitätsrate (Cosgrove et al. 2003). Aggressive Infektionskontrolle, die Isolierung infizierter Patienten und der rationale Antibiotikaeinsatz haben besonders in nordeuropäischen Ländern (Dänemark, Schweden) dazu geführt, dass der Anteil solcher Infektionen hier unter 1% liegt (Lepelletier 2006, Abb. 5).

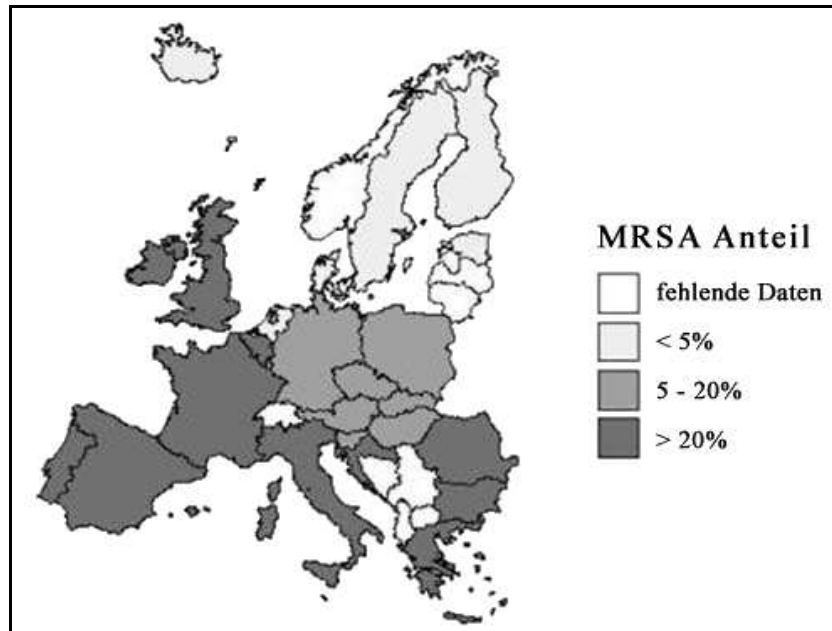


Abb. 5: Geografische Variationen des MRSA Anteils in Europa 1999-2002 (aus Tiemersma et al. 2004).

Die Häufigkeit und Verteilung von MRSA variiert allerdings nicht nur interregional, sondern auch innerhalb von Krankenhäusern zwischen verschiedenen klinischen Disziplinen. Die Chirurgie steht dabei zusammen mit intensivmedizinischen und internistischen Abteilungen im Vordergrund (RKI 2005). Die Tatsache, dass sich in jüngster Zeit Berichte über Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus* mehren, lässt befürchten, dass in naher Zukunft bestimmte *Staphylococcus aureus*-Stämme durch eine traditionelle Antibiotikatherapie nicht mehr behandelbar sein werden (Tenover et al. 2001). Die daraus resultierenden medizinischen, ökonomischen und sozialen Kosten wären unüberschaubar und viel größer, als etwaige Aufwendungen für eine effektive Kontrolle von MRSA (Gould 2006, Tab. 3).

Tab. 3: Gegenüberstellung von Mortalität, postoperativer Hospitalisationsdauer (POH) und durchschnittlichen Behandlungskosten 3er Studiengruppen/ USA: Kontrollgruppe (KG) ohne Wundinfektion (WI), Patienten mit MSSA-WI, Patienten mit MRSA-WI (aus Engemann et al. 2003).

Outcome	KG ohne WI (N=193)	MSSA-WI (N=165)	MRSA-WI (N=121)
Mortalität (in %)	2.1	6.7	20.7
POH (Median in d)	5	14	23
Kosten (Median in US\$)	29 455	52 791	92 363

2.4 Ausbreitung und Übertragung von MRSA

Bald nach den ersten MRSA-Ausbrüchen innerhalb der Krankenhäuser zeigte sich, dass die Organismen oft nicht gänzlich aus den Einrichtungen eradiziert werden konnten, und folglich endemisch wurden (Boyce 1989). Erkrankungsfälle mit solchen Keimen repräsentieren die „Basisrate“ nosokomialer Infektionen einer Einrichtung, wohingegen epidemische Infektionen durch ein signifikantes Überschreiten dieser Basisrate definiert sind (Singh et al. 2006), wie es beispielsweise in Ausbruchssituationen beobachtet wird (Tenover et al. 1995). Mögliches Reservoir für die Erreger sind dabei infizierte oder kolonisierte Patienten, Personen mit unbekanntem Trägerstatus (Pflegepersonal, asymptomatische Patienten) sowie unbelebte Oberflächen innerhalb der Klinik. Durch MRSA kolonisierte oder infizierte Patienten stellen dabei wahrscheinlich das Hauptreservoir für eine Verbreitung im Krankenhaus dar (Thompson et al. 1982). Doch auch der unbekannte Trägerstatus von MRSA unter Pflegepersonal (6% der Mitarbeiter, Cesur und Çokça 2004) oder bei asymptomatischen Patienten (7% der Neuaufnahmen, Hidron et al. 2005) sind von gewichtiger Bedeutung. Ausgehend vom Vestibulum nasi, dem eigentlichen Reservoir für *Staphylococcus aureus*, kann sich der Erreger auf andere Bereiche der Haut (u. a. Hände, Axilla, Perinealregion) und Schleimhäute (z.B. Rachen) der Träger ausbreiten (RKI 2007a), bis er in einem suszeptiblen Organismus eine Infektion verursacht (von Eiff et al. 2001). Hinzu kommt, dass *Staphylococcus aureus* auch auf unbelebten Objekten für Monate überleben kann (Kramer et al. 2006). Gerade Oberflächen mit wechselndem Handkontakt (Tastaturen, Wasserhähne) sind besonders häufig mit Krankheitserregern verunreinigt und können als Vektoren für eine Übertragung dienen (Bures et al. 2000). Auch Gegenstände in der näheren Umgebung von MRSA-Trägern wie Bettlaken, Kleidung, Schränke oder Blutdruckmanschetten sind häufig kontaminiert (Boyce et al. 1997) und können so auch ohne direkten Patientenkontakt zur unerkannten Übertragung auf andere Personen führen. Einige Stämme scheinen für die Ausbreitung in der näheren und weiteren Umgebung des betreffenden Patienten besonders prädestiniert zu sein, was auch als Epidemietendenz bezeichnet wird (Peters und Pulverer 2001).

Infektionen treten entweder auf Grund einer bereits bestehenden Besiedlung mit Krankheitserregern oder aber durch eine intrahospitale Übertragung von anderen infizierten oder kolonisierten Patienten auf (Mikolajczyk 2007). Oftmals stammen die Keime vom Patienten selbst (endogene Infektion) und sind nicht zwangsläufig nosokomial erworben (von Eiff et al. 2001), was nicht nur auf MRSA- sondern auch auf MSSA-Stämme zutrifft. So zeigte sich im Rahmen einer Studie, dass unter Patienten mit *Staphylococcus aureus*-Bakteriämien Isolate

aus Blutkulturen in mehr als 80% mit Abstrichen aus dem Vestibulum nasi identisch waren (von Eiff et al. 2001). In einer anderen Arbeit entwickelten rund 25% kolonisierter MRSA-Träger im Verlauf ihrer Hospitalisation eine Infektion (Davis et al. 2004). Die häufigsten Risikofaktoren für eine Besiedlung mit MRSA, deren Rate beispielsweise in der amerikanischen Bevölkerung 1% beträgt (CDC 2005), sind vorausgegangene Hospitalisation und Antibiotikabehandlung, Versorgung in einer Pflegeeinrichtung, jegliche Art von Katheterisierung, Immundefizienz, Diabetes mellitus sowie intravenöser Drogenkonsum (BOP 2005). In der Regel werden MRSA jedoch durch Schmierinfektion übertragen (Mellmann et al. 2005), das heißt auf exogenem Weg, direkt von Patient zu Patient, oder indirekt von Patient zu Kontaktperson/ Umwelt sowie Kontaktperson/ Umwelt zu Patient (Henderson 2006), was auch als Kreuzinfektion bezeichnet wird. In den meisten Fällen erfolgt die Übertragung durch die Hände des Pflegepersonals (Kampf und Kramer 2004), wobei gerade unter Ärzten die Compliance bezüglich Händedesinfektionsmaßnahmen mit unter 50% besonders gering ist (Pittet 2001). Die Anzahl von MRSA-Trägern auf einer Station hat offenbar direkten Einfluss auf die Häufigkeit solcher Kreuzinfektion (Nixon et al. 2006, Abb. 6). Tröpfchen- oder Luftübertragung spielen nur eine sehr geringe Rolle (Hornberg et al. 2006).

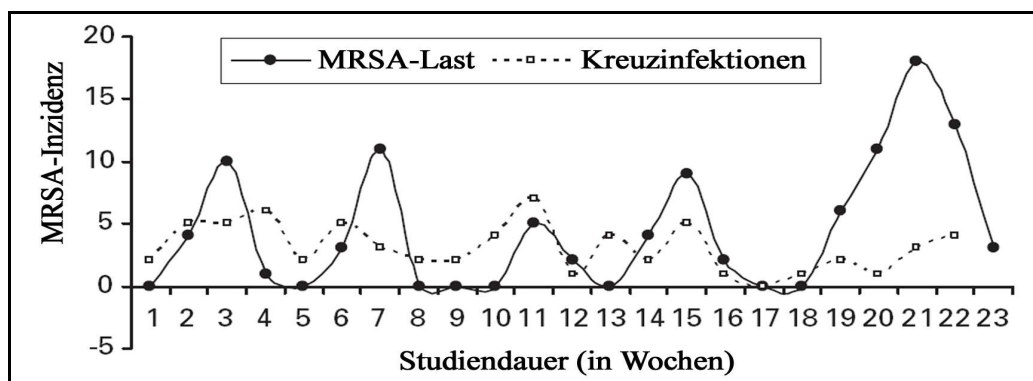


Abb. 6: Korrelation zwischen Episoden hoher MRSA-Belastung und der Nummer von Kreuzinfektion auf einer orthopädischen Station (aus Nixon et al. 2006).

2.5 Vermeidungsstrategien für Infektionen mit MRSA

Eine Reihe von Faktoren hat bekanntermaßen Einfluss auf das Risiko der Übertragung oder den Erwerb von MRSA im klinischen Umfeld (Muto et al. 2003). Marshall et al. (2004) teilen diese Risikofaktoren in vier Kategorien ein, welche mögliche Ansatzpunkte einer Kontrolle bieten. Hierzu zählen die Verhinderung einer Selektion Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Populationen, die Reduktion des Pools kolonisierter Patienten oder Mitarbeiter, die Vermeidung einer Übertragung von Patient zu Patient sowie die Verhinderung einer Infektion bei bereits kolonisierten Patienten (Marshall et al. 2004, Tab. 4). Diese Maßnahmen erfordern

eine Schulung aller an der Patientenversorgung beteiligten Berufsgruppen sowie eine Aufklärung der weiteren Personen, die mit den MRSA-Trägern in Kontakt stehen (Hornberg et al. 2006). Trotz der zusätzlichen Kosten durch erweiterte Hygienemaßnahmen lassen sich Einsparungen durch die Senkung der MRSA-Rate erreichen (Karchmer et al. 2002).

Tab. 4: Wichtige Kriterien des MRSA-Managements (aus Marshall et al. 2004, RKI 2007a).

Maßnahmen zur Kontrolle der MRSA-Situation
<ul style="list-style-type: none"> • Verhinderung einer Selektion Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>-Populationen (adäquater und kontrollierter Antibiotikaeinsatz) • Reduktion des Pools kolonisierter Patienten oder Mitarbeiter (Entlassung infizierter/ kolonisierter Patienten, Sanierung bekannter MRSA-Träger) • Vermeidung einer Übertragung von Patient zu Patient (Screening, Handhygiene, Tragen von Schutzkleidung und Handschuhen, Kohortenbetreuung, Patientenisolierung) • Verhinderung einer Infektion bei bereits kolonisierten Patienten (Sanierung) • Eingehende Information und Schulung des Personals • Information der Folgeeinrichtung bei Verlegung MRSA-kolonisierter/ -infizierter Patienten

Neben präventiven Maßnahmen gehört die Surveillance (Überwachung) zu den wichtigsten Empfehlungen der Bekämpfung von MRSA (Muto et al. 2003). Sie erfordert jedoch eine genaue Kenntnis der Verteilung und Epidemiologie von MRSA-Stämmen (Deurenberg et al. 2007). Eine Grundlage hierfür bildet die Genotypisierung zur Verifizierung der Klonalität (Identität) verschiedener Stämme, wie sie im Falle eines gehäuften Nachweises von MRSA bei mehreren Patienten, die in einem räumlichen und zeitlichen Zusammenhang stehen, anzustreben ist (RKI 2007a). Diese Techniken beinhalten unter anderem die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) sowie die Typisierung der variablen Region des Proteins A (*Spa*-Typisierung, Aires de Sousa und de Lencastre 2004). All diese Methoden ermöglichen nicht nur die Abgrenzung zwischen Pseudoausbrüchen und tatsächlichen MRSA-Ausbrüchen, welche bis zur Schließung ganzer Stationen führen können, sondern stellen auch eine sehr gute Kontrolle für die Wirksamkeit von Hygienemaßnahmen dar (Mellmann et al. 2005). Andererseits lassen sich bei Patienten mit rezidivierenden Infektionen Aussagen über einen möglichen Rückfall (wahrscheinlich bei identischem Genotyp) oder eine Neuinfektion durch einen anderen Stamm (Bannerman und Peacock, 2007) machen. Zudem bedeuten die schnelle Eindämmung eines Ausbruchs und die Verhinderung von Übertragungen einen Schutz für den Patienten (Mellmann et al. 2005). Ein Beispiel für die Effektivität konsequenter Surveillance- und Präventivmaßnahmen ist Dänemark, wo die MRSA-Rate in Blutkulturen von über 30% in den 60er Jahren auf heute unter 1% gesenkt werden konnte (Muto et al. 2003).

2.6 Verfahren zur Typisierung von *Staphylococcus aureus*

Das Wissen über die Ausbreitung und Verwandtschaft eines Pathogens ist essentiell für das Verständnis der Epidemiologie einer nosokomialen Erkrankung sowie für die Durchführung einer rationalen Kontrollmethode dieses Erregers (Singh et al. 2006). Dabei liegt die Aufgabe des Typisierungsverfahrens darin festzustellen, ob in epidemiologischem Zusammenhang isolierte Stämme auch genetisch verwandt sind (Singh et al. 2006). Über etwa 30 Jahre hinweg stellten die phänotypische Charakterisierung und die Phagentypisierung Standardverfahren zur Typisierung von MRSA-Stämmen dar (Strommenger et al. 2006). Diese Herangehensweise hat sich mit der Entwicklung DNA-basierter Untersuchungstechniken grundlegend geändert, da derartige Verfahren chromosomale Variationen registrieren und deutliche Vorteile bezüglich Typisierbarkeit, Diskriminationsfähigkeit und Reproduzierbarkeit bieten (Cookson et al. 2007). Solche genotypischen Techniken, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen, beinhalten unter anderem die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) sowie die Typisierung der variablen Region des Proteins A (*Spa*-Typisierung, Aires de Sousa und de Lencastre 2004).

Die PFGE ist die Methode der Wahl für viele epidemiologische Untersuchungen (Singh et al. 2006) und wird nach wie vor als „Goldstandard“ der molekularen Typisierung von MRSA angesehen (Strommenger et al. 2006). Sie basiert auf der Trennung genomischer DNA im Agarosegel, welche zuvor durch selten schneidende Restriktionsenzyme verdaut wurde (Maslow et al. 1993). Sie gibt daher einen relativ umfassenden chromosomalen Überblick, da 90% des Genoms (Summe der Restriktionsfragmente) gescannt werden (Singh et al. 2006). Die Auftrennung der DNA-Fragmente in diskrete Bandenmuster erfolgt dabei unter Anlegen wechselnder elektrischer Spannungen (Tenover et al. 1995), da größere DNA-Moleküle (>15kb) nur durch entsprechende Verformung die siebartigen Poren des Agarosegels überwinden können. Die Ergebnisse sind „DNA-Fingerabdrücke“ der jeweiligen Bakterienstämme (Arbeit et al. 1990, Goering und Winters 1992), welche zur Identifizierung genetischer Verwandtschaft oder Klonalität der Erreger genutzt werden können. Die PFGE gilt dabei als eines der verlässlichsten und diskriminatorischsten Typisierungsverfahren, das eine adäquate Erfassung von DNA-Polymorphismen erlaubt (Prevost et al. 1992, Tenover et al. 1994). Sie ist somit besonders wertvoll für die Analyse klinischer Ausbruchssituationen, da selbst minimale chromosomale Veränderungen detektiert werden, welche in diesem Fall von epidemiologischer Bedeutung sein können (Mc Dougal et al. 2003). Das dieser Arbeit zu Grunde liegende GenePath® System basiert auf der Pulsfeld-Methode CHEF (Contoured

Clamped Homogeneous Electric Field), welche durch Anordnung multipler Elektroden ein gepulstes homogenes elektrisches Feld gewährleistet. Hierbei müssen die DNA-Moleküle wegen der periodischen Variation des elektrischen Feldes im Winkel von 120° ihre Orientierung durch Streckung und Stauchung der Helixstruktur innerhalb des Agarosegels ändern. Nach diesem Umorientierungsprozess der DNA-Fragmente, welcher mit wachsender Moleküllänge mehr Zeit in Anspruch nimmt, erfolgt die Vorwärtsbewegung in Trennrichtung. Dadurch wird die Separation auch großer DNA-Fragmente ($>1\text{Mb}$) ermöglicht, welche nicht durch die konventionelle PFGE aufgelöst werden können (O'Brien et al. 2006). Da derartig lange Fragmente leicht brechen oder reißen, wird das Material vor Bearbeitung in kleine Agaroseblöcke eingebettet, um unnötige Scherkräfte, wie sie schon beim Pipettieren auftreten, zu vermeiden. Präparation und Verdau der DNA ziehen sich hierbei über mehrere Tage hin, da Puffer und Enzyme erst in die Agarose diffundieren müssen. Das hierbei verwendete SmaI Restriktionsenzym führt zur Bildung von 15-20 Restriktionsfragmenten zwischen 10-70kb (Maslow et al. 1993), welche zur anschließenden Klassifizierung der Pulsfeldtypen herangezogen werden (Tenover et al. 1995). Da die vergleichende Analyse der Pulsfeldmuster durch den Untersucher nur bis zu einem gewissen Grad objektivierbar ist (Tenover et al. 1995), bleibt die intra- und interlaborative Reproduzierbarkeit der PFGE trotz standardisierter Interpretationskriterien nach wie vor begrenzt (van Belkum et al. 1998b, Mulvey et al. 2001, Murchan et al. 2003). Obwohl einige Autoren die Eignung für epidemiologische Langzeitstudien anzweifeln (Blanc et al. 2002), scheint die PFGE als „Goldstandard“ für nosokomiale Ausbruchssituationen (Deplano et al. 2000, Aucken et al. 2002) durch neuerliche Fortschritte im Bereich der Gelanalyse-Software und standardisierte Arbeitsprotokolle künftig auch für den Einsatz in längerfristigen Untersuchungen geeignet (Swaminathan et al. 2001, Deplano et al. 2006, Hallin et al. 2007).

Neben der PFGE existieren auch so genannte PCR-basierte Typisierungsmethoden, welche die Synthese großer Mengen einer Zielsequenz innerhalb des Genoms ermöglichen (Mullis 1990). Da die sequenzierten DNA-Segmente, welche oft weniger als 10% des Chromosoms repräsentieren, relativ klein sind ($\leq 5\text{kb}$), werden selbst minimale genetische Veränderungen entdeckt, insofern diese die zu untersuchende Zielsequenz betreffen (Singh et al. 2006). Die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) enthüllt hierbei langsame Umbauprozesse in konservierten Genen, welche evolutionäre Langzeitveränderungen widerspiegeln (Gomes et al. 2005), weshalb sie sich besonders gut für die Studie globaler Epidemiologie und Populationsbiologie bakterieller Pathogene eignet (Maiden et al. 1998). Durch den Vergleich von insgesamt sieben Genloci ergeben sich so genannte Sequenztypen (ST), welche bestimm-

ten Erregerlinien zugeordnet werden können (Enright und Spratt 1999). Hierbei gelten Stämme mit gleichen Sequenzen in allen Genloci als klonal, solche mit fünf oder sechs Übereinstimmungen als Mitglieder desselben klonalen Komplexes (CC, „clonal complex“, Lindsay et al. 2006), welche durch das eBURST-Verfahren als „Goldstandard“ entwicklungsgeschichtlicher Untersuchungsmethoden ermittelt werden (Mellmann et al. 2007). Die MLST ist eine relativ teure und langsame Methode mit begrenzter Diskriminationsfähigkeit, weshalb sie für die Untersuchung von Ausbruchssituationen nicht geeignet ist (Cai et al. 2007). Ein Abgleich der Sequenzen ist über eine zentrale Internetdatenbank (<http://www.mlst.net/>) möglich.

Eine weitere PCR-basierte Typisierungsmethode ist die durch Frénay et al. (1994) entwickelte *Spa*-Typisierung. Grundlage dieses Verfahrens ist das Vorhandensein des *Staphylococcus aureus*-Proteins A (*Spa*). Es ist ein in der Zellwand verankertes Protein mit vier oder fünf Domänen, welche die Fc-Region des Immunglobulins G (IgG) binden (Uhlén et al. 1984). Durch die reverse Bindung von IgG auf der Zelloberfläche entzieht sich das Bakterium der effizienten Phagozytose durch neutrophile Granulozyten (Foster 2005). Bei der *Spa*-Typisierung selbst handelt es sich um eine vergleichende Single-Lokus-Sequenztypisierung der polymorphen X-Region des Proteins A (Frénay et al. 1996). Diese Region besteht aus einer Reihe von 21-30bp langen Tandemrepeats (Ridom *Spa*-Server, Zugriff 09.12.2007), deren Diversität auf Deletionen und Duplikationen der Repeats, selten auch auf Punktmutationen zurückgeht (Shopsin et al. 1999, Kahl et al. 2005). Die Repeats werden einem numerischen Code zugeordnet, wodurch der *Spa*-Typ an Hand der Reihenfolge spezifischer Repeats eindeutig bestimmt ist (Harmsen et al. 2003). Bisher sind in einer zentralen Datenbank (<http://spaserver.ridom.de>) über 200 *Spa*-Repeats und mehr als 3200 *Spa*-Typen aus 47 Ländern beschrieben worden (Ridom *Spa*-Server, Zugriff 09.12.2007). Das *Spa*-Gen (Abb. 7) umfasst ungefähr 2000 Basenpaare und enthält eine Anzahl funktionell verschiedener Regionen: eine F_C-bindende Region, weiterhin die so genannte Xr-Region und, am C-Terminus, eine Sequenz Xc, die für die Zellwandbefestigung verantwortlich ist (Schneewind et al. 1992). Die F_C-bindende Region ist aus Repeats mit je 160bp aufgebaut, während die Xr-Region eine variable Anzahl von Repeats mit meist 24bp enthält (Guss et al. 1984, Uhlén et al. 1984). Die Existenz gut konservierter Abschnitte, welche die X-Region flankieren, erlaubt den Einsatz von Primern zur PCR-Amplifikation und Sequenztypisierung (Shopsin et al. 1999). Die einzelnen Schritte der *Spa*-Typisierung umfassen DNA-Extraktion, PCR der X-Region, Sequenz-PCR sowie Sequenzanalyse.

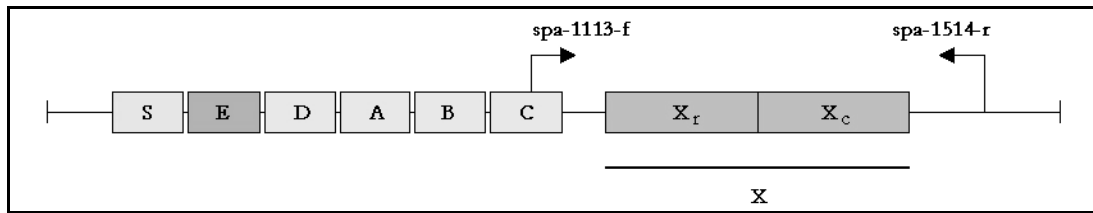


Abb. 7: Vereinfachte Struktur des Protein-A-Gens. Dargestellt sind die Segmente des Gens, welche für die Signalsequenz (S), den IgG-bindenden Teil (A-D), eine zu A-D homologe Region (E) und den COOH Terminus (X) kodieren, der die polymorphe X Region (Xr) und die Zellwandbefestigungssequenz (Xc) enthält. Die Primer sind vom 5' Ende des Vorwärtsstranges aus nummeriert (modifiziert nach Uhlén et al. 1984).

Die *Spa*-Typisierung verfügt nicht nur über eine gute Diskriminationsfähigkeit, welche mit derjenigen der PFGE vergleichbar ist (Koreen et al. 2004, Hallin et al. 2007), sondern sie ist auch hochreproduzierbar (Aires de Sousa et al. 2006). Zudem ist ein automatischer Abgleich mit einer ständig aktualisierten, zentralen Internetdatenbank (<http://spaserver.ridom.de>) möglich, wodurch die epidemiologische Analyse bestimmter Linien sowohl innerhalb als auch zwischen Einrichtungen der Pflege- und Gesundheitsversorgung erleichtert wird. Die *Spa*-Sequenzanalyse eignet sich zudem nicht nur für die Studie von Ausbruchssituationen (Koreen et al. 2004, Mellmann et al. 2005). Durch die Entwicklung des so genannten BURP (Based upon Repeat Pattern) Mechanismus ist es mittlerweile möglich, Langzeitveränderungen innerhalb des *Spa*-Gens zu detektieren (Mellmann et al. 2007, Faria et al. 2007). Hierbei werden typischerweise solche Stämme zu klonalen *Spa*-Komplexen (*Spa*-CC, „*Spa*-Clonal Complex“) zusammengefasst, welche sich durch maximal drei genetische Veränderungen (Repeatduplikation, -deletion etc.) innerhalb der X-Region voneinander unterscheiden, wodurch sich mit dem eBURST-Verfahren vergleichbare Gruppierungsergebnisse ergeben (Mellmann et al. 2007).

3 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Arbeit war einerseits, die MRSA-Situation am Universitätsklinikum Jena einschließlich des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg im Verlauf des Jahres 2004 mit Hilfe der *Spa*-Typisierung zu erfassen, um Angaben über Stammverbreitung und mögliche Übertragungswege im Krankenhaus zu erhalten. Andererseits wurde die *Spa*-Sequenzanalyse in Bezug auf Diskriminationsfähigkeit, Interpretationsfähigkeit, Praktikabilität und Kostenaufwand dem hiesig etablierten Typisierungsverfahren der Pulsfeld-Gelelektrophorese gegenübergestellt, um eine mögliche Einführung dieser Technik am Klinikum Jena abwägen zu können.

4 Material

4.1 Untersuchungsmaterial

Für die Studie wurden sämtliche MRSA-Isolate der Abteilungen des Universitätsklinikums Jena sowie des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg aus dem Jahr 2004 untersucht, wobei ein MRSA-Screening von Risikopatienten (Zuordnung laut Hygieneplan Universitätsklinikum Jena, 2005) erst gegen Ende des Untersuchungszeitraumes eingeführt wurde. Das Universitätsklinikum Jena ist ein Krankenhaus der Maximalversorgung mit 1375 Planbetten und versorgt die Region Jena, insbesondere aber auch in spezialisierten Fragestellungen mit 50% seiner Kapazität überregional in Thüringen und darüber hinaus. 750 Ärztinnen und Ärzte sowie 1000 Schwestern und Pfleger aus 23 Fachabteilungen behandelten im Jahr 2004 etwa 45000 stationäre Patienten, erbrachten 24000 Operationen, 16000 tagesklinische Behandlungen und 250000 ambulante Konsultationen (Universitätsklinikum Jena 2004). Beim Rudolf-Elle-Krankenhaus in Eisenberg handelt es sich um eine 360 Betten fassende Einrichtung der Regelversorgung, in der sich auch die orthopädische Abteilung des Universitätsklinikums Jena befindet, welche allein über 225 Planbetten verfügt. Zwischen Januar und Dezember 2004 wurden hier von 74 Ärzten und 236 Pflegekräften 1806 ambulante sowie 9336 stationäre Patienten versorgt, wovon etwa 58% auf die Klinik für Orthopädie entfielen (Rudolf-Elle gGmbH 2004). Sämtliche am mikrobiologischen Institut isolierten MRSA-Stämme des Rudolf-Elle-Krankenhauses wurden sowohl mittels *Spa*-Sequenzanalyse als auch mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese typisiert. Bei den Stämmen des Universitätsklinikums Jena wurde lediglich die *Spa*-Typisierung durchgeführt. Es erfolgte auch eine *Spa*-Typisierung der Mehrfachisolate des gleichen Patienten. Als Vergleichsgruppe dienten Daten sämtlicher MSSA-Isolate beider Einrichtungen des Jahres 2004, welche mittels Data-Warehouse-Abfrage aus dem Labordatensystem des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena ermittelt wurden.

4.2 Geräte

Elektrophoresegerät Bio Rad DNA SUB Cell™

Bio Rad, Deutschland

Image Master ® VDS

Pharmacia Biotech, Deutschland

Inklusive Software:

Liscap © 1995

Image Master 1D Elite Version 3.01	
©Mega BACE™ DNA Analysis System 1000	Molecular Dynamics, USA
©Mega BACE™ Sequenzer 500	
Instrument Operator's Guide Version 2.0	
Inklusive Software:	
©Mega BACE™ Instrument Control Manager	
©Mega BACE™ Score Card	
©Ridom Staph Type Version 1.1.21	Ridom GmbH, Deutschland
PFGE CHEF – DR™ III PFGE	Bio Rad, Deutschland
Thermocycler Gene Amp PCR Sys 2400	Perkin Elmer Norwalk, USA
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Deutschland
Ultraspec 2000 UV/ Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech, Deutschland
Vakuumzentrifuge DNA Speed Vac®	Savant, USA
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Hettich Rotanta	Hettich, Deutschland

4.3 Chemikalien

Enzyme:

Lysozym/ Lysostaphin (25mg/ml, 2mg/ml)	Sigma, USA
Proteinkinase (>600 u/ml)	Qiagen GmbH, Deutschland
Taq DNA Polymerase 1u/μl	Fermentas, Deutschland

Primer:

<i>Spa</i> -1113fw Oligonukleotidgemisch (ONG)	Institut für Virologie, FSU-Jena
5'- TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C - 3'	
<i>Spa</i> -1514rv Oligonukleotidgemisch (ONG)	Institut für Virologie, FSU-Jena
5'- CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT - 3'	
Stammlösung 10pM: DEPC Wasser : ONG (optische Dichte 12.4 E) = 1:43 fw, 1:46 rv	
Stammlösung 5pM: DEPC Wasser : Stammlösung 10pM Primer = 1:1	

Stammlösungen:

50x TAE	2M TRIS, 57.1ml Essigsäure, 50mM EDTA
TE-Puffer	10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7.4

Standards:

100bp DNA Ladder	Promega, USA
------------------	--------------

Spa-Ladder (SL)

Selbstangefertigtes Gemisch verschiedener PCR-Produkte bereits bekannter *Spa*-Sequenzen der Länge 16, 14, 10 und 8 *Spa*-Repeats im Verhältnis 1:2:2:1.

Zusätze:

Agarose Nu Sieve®	Cambrex Bio Science, USA
Aqua dest. (Ultra-Pure Water System)	Millipore, Deutschland
DEPC Wasser	Carl Roth GmbH, Deutschland
dNTP Mix	Fermentas, Deutschland
Ethanol 96%	J. T. Baker, USA
Ethidiumbromid (1mg/ml)	Bio Rad, Deutschland
MgCl ₂ 25mM	Fermentas, Deutschland
PCR Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	Fermentas, Deutschland
Laufpuffer	
Orange G 0.5%	Sigma, USA
10ml Aqua dest.	Millipore, Deutschland
10ml Glycerol	Riedel de Haën AG, Deutschland
25mM EDTA	Pharmacia Biotech, Deutschland

4.4 Kits

BBL Crystal Identifizierungssystem	BD, USA
DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, England
DYEnamic™ ET dye terminator	
GenePath® Enzyme Module Gruppe 1	Bio Rad, Deutschland
Lysepuffer 1	
Lysozym/ Lysostaphin (25mg/ml, 2mg/ml)	
Sma I Puffer & Restriktionsenzym (5u/µl)	
GenePath Gel Kit	Bio Rad, Deutschland
GenePath Universalmodul	Bio Rad, Deutschland
CleanCut™ Einbettungsagarose	
Kontroll-Blocks (NCTC <i>S. aureus</i> Stamm 8325)	
Lambda Ladder Standard	
Proteinase K-Puffer & Proteinase K (>600 u/ml)	
Waschpuffer (10x, 1x, 0.1x)	
Zellsuspensionspuffer	

Mega BACE™ Kit	Amersham Biosciences, England
Mega BACE™ 10x Running Buffer	
Mega BACE™ Loading Solution	
Mega BACE™ Long Read Matrix	
Mikronaut-Sprint GP5 Plates	Merlin GmbH, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit (250)	Quiagen GmbH, Deutschland
AE Puffer	
AL Puffer	
Aufreinigungssäulchen	
AW1/ 2 Puffer	
Proteinkinase K (>600 u/ml)	
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Quiagen GmbH, Deutschland
Aufreinigungssäulchen	
Buffer PB und PE	
Slidex MRSA-Detection-Kit	Biomérieux ® SA, Frankreich
Slidex ® Staph-Kit	Biomérieux ® SA, Frankreich

4.5 Nährmedien

Luria-Nährbouillon	Invitrogen™, USA
LB Broth Base (20g/l Aqua dest.)	
Mannitolagarplatten	Merck, Deutschland
MRSA Select Agarplatten	Bio Rad, Deutschland
Schafblutagarplatten	Oxoid, England
Columbia-Blood-Agar-Base (39g/l Aqua dest.)	
35% Schafblut	

4.6 Zubehör

CENTRI SEP Spin Columns	Princeton Separations, USA
Kryoröhrchen Cryobank™	Mast Diagnostica, Deutschland
Mikro Tubes 1.5/ 2ml	Sarstedt, Deutschland
PCR Tubes 0.2ml	Biozym Scientific, Deutschland
Pipetten 20µl-1000µl	Eppendorf, USA
Skirted 96 PCR Plates	Sorenson™ BioScience, USA

5 Methoden

5.1 Isolierung von *Staphylococcus aureus*

Die Isolierung von *Staphylococcus aureus* erfolgte unter Routinebedingungen. Einerseits wurden verdächtige Kolonien aus bebrütetem Untersuchungsmaterial an Hand ihres charakteristischen, schwachgelben Wachstums (mit oder ohne Hämolyse, vgl. Abb. 2) auf Blutagar als Staphylokokken vorausgewählt. Andererseits gewann mit der Einführung des MRSA Screenings gegen Ende des Jahres 2004 die Isolierung möglicher Keime auf MRSA-selektivem Agar (MRSA Select, rotes Wachstum) eine zunehmende Bedeutung. Die so gewonnenen Stämme wurden anschließend einem Agglutinationstest (Slidex ® Staph-Kit, Nachweis von Koagulase, Protein A und/oder antigenspezifischer Oberflächenproteine, Spezifität = 98.8%) unterzogen, um die Zuordnung zur Art *Staphylococcus aureus* zu bestätigen. Gegebenenfalls wurde zusätzlich ein Katalasetest durchgeführt. Sterile Materialien (Liquor, Blut, Gelenkpunktate etc.) wurden routinemäßig durch ein miniaturisiertes Identifizierungssystem (BBL Crystal™ Testsystem zur Identifizierung grampositiver Bakterien) der Spezies *Staphylococcus aureus* zugeordnet. Anschließend wurde das entsprechende Antibio-gramm (Mikronaut-Sprint GP5 Plates) erstellt. Im Falle einer Oxacillinresistenz schloss sich nun noch der Nachweis des PBP 2A (Slidex MRSA-Detection-Kit) zur endgültigen Diagnose-sicherung eines MRSA an. Diese Isolate wurden nochmals auf Schafblutagar überimpft, 24h bei 37°C bebrütet und anschließend weiterverarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren (Keimzahl von $\approx 10^9$, Kryoröhrchen Cryobank™).

5.2 Spa-Typisierung

5.2.1 DNA-Extraktion

Hierfür wurden einzelne Kolonien der auf Agarplatten isolierten Präparate beziehungsweise tiefgefrorenen MRSA-Isolate (Kryoröhrchen Cryobank™) erneut auf Schafblutagarplatten ausgestrichen und 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde etwa 1/8 des Bakterienrasens mit einer Impföse geerntet und in 1.5ml messende Tubes mit 170µl TE-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 30µl Lysozym-Lysostaphin-Gemisch (Verhältnis 25:2) erfolgte nun die Inkubation für 60min in einem Thermomixer bei 37°C. Im weiteren Verlauf wurden unter Verwendung des QIAgen-Kits (QIAamp® DNA Mini Kit) 20µl Proteinkinase zugegeben und anschließend 60min bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert, bis die Lösung schleierfrei

erschien. Nach Zugabe von 200µl AL Puffer und darauf folgender Inkubation für 10min bei 70°C wurden 200µl 96%iges Ethanol hinzupipettiert, gevortex und die Lösung auf die Säulchen des verwendeten Kits gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 5900g (Eppendorf Centrifuge 5415) und Verwerfen der abzentrifugierten Flüssigkeit wurden 500µl AW1 Puffer zugegeben und erneut 1 Minute bei 5900g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und danach 500µl AW2 Puffer zugegeben, und die Säulchen erneut 1min bei 15300g zentrifugiert. Nach Abgießen der ausgespülten Lösung und Trocknung der Säulchen bei 15300g für 1min kamen 200µl AE Puffer zur Probe, die nach fünfminütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur letztmalig 1min bei 5900g zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran war die DNA-Konzentration photometrisch zu messen (UV/ Visible Spectrophotometer), wobei die Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 gemischt wurde. Die so gewonnene DNA konnte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C bis zu einem halben Jahr tiefgefroren werden.

5.2.2 PCR der X-Region

Folgende Schritte orientierten sich am Ridom DNA-Sequenzierungsprotokoll (Version 1.1, 2004). Zunächst wurde die extrahierte DNA in einem separaten Tube mit DEPC Wasser auf eine Massenkonzentration von etwa 100ng/µl verdünnt. Danach wurde ein PCR-Mastermix für sämtliche Proben sowie eine Negativkontrolle pipettiert (Tab. 5), und die PCR nach Zugabe von 1µl DNA-Template unter Einstellung nachstehender Parameter gestartet (Tab. 6).

Tab. 5: Für den PCR-Mastermix (50µl je Ansatz) einzusetzende Reagenzien.

Reagens	Menge je Probe	Reagens	Menge je Probe
DEPC Wasser	35µl	Taq Polymerase	2µl
PCR-Puffer	5µl	Primer <i>Spa</i> -1113-fw, 10pM	1µl
MgCl ₂	3µl	Primer <i>Spa</i> -1514-rv, 10pM	1µl
dNTP-Mix	2µl	DNA Template	1µl

Tab. 6: Temperaturprofil für die DNA-Amplifikation in der PCR.

Temperatur in °C	Zeit in min : s		Zyklenanzahl
80	5 : 00	Aktivierung Polymerase	1
94	0 : 45	Denaturierung	} 35
63	0 : 45	Annealing	
72	1 : 30	Verlängerung	
72	10 : 00	Verlängerung	1
4	∞	Reaktionsstopp	1

5.2.3 Kontrolle der PCR im Agarosegel

Nach erfolgter PCR wurden die Proben im 1.5%igen Agarosegel ausgewertet, wobei zusätzlich zum Standardladder noch ein selbstangefertigter „Spa-Ladder“ (SL) aus verschiedenen langen *Spa*-Repeats zum besseren Vergleich in das Gel gegeben wurde. Zu 2µl Ladder beziehungsweise DNA wurden 5µl Laufpuffer beigelegt und das Gel für 90min bei einer Spannung von 150V und einer Stromstärke von 400mA in der Elektrophoresekammer (Bio Rad DNA SUB Cell™) belassen, die vorab mit etwa 400ml 1x TAE-Puffer zu füllen war. Nach jeweils zehnminütiger Färbung in Ethidiumbromid (150µl der 1mg/ml Ethidiumbromid-Grundlösung + 400ml Aqua dest.) und anschließender Entfärbung in Aqua dest. wurde das Gel mit dem Image Master® System fotografiert und elektronisch gespeichert (Abb. 8).

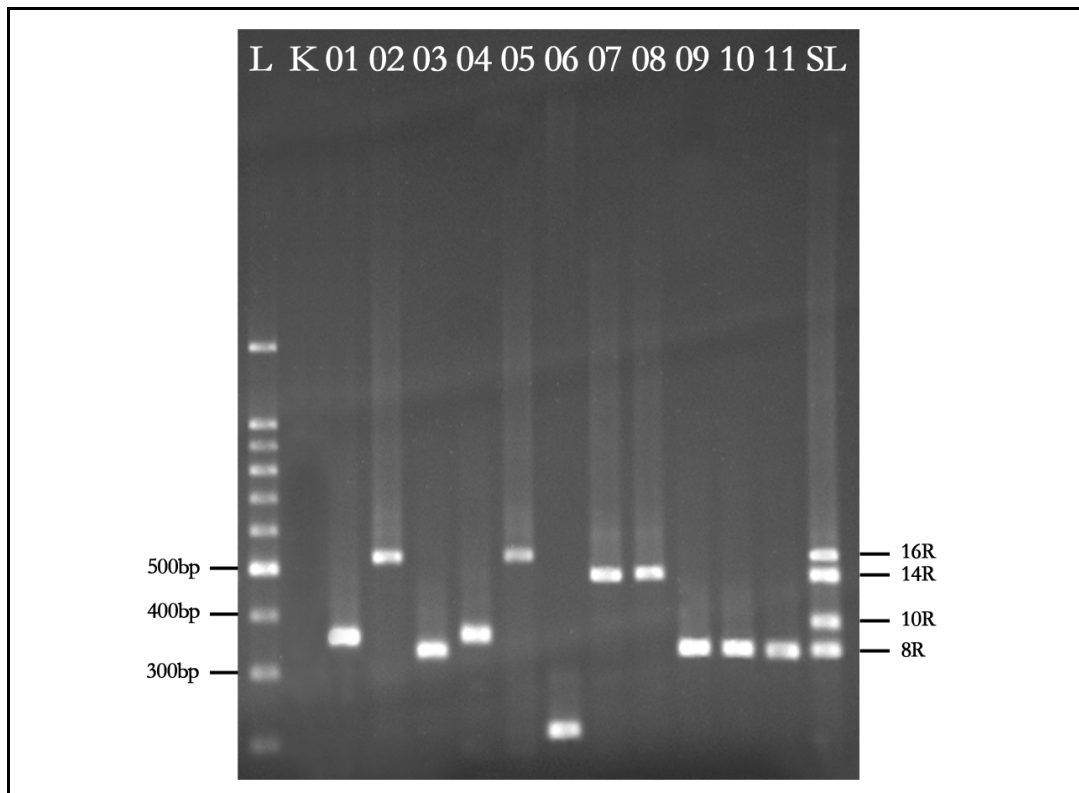


Abb. 8: Kontrolle der PCR Produkte mittels Gelelektrophorese. L = Standardladder, K = Negativkontrolle, 01-11 = Probennummer, SL = „Spa-Ladder“. Die Proben 03, 06, 09, 10 und 11 besitzen eine Basenlänge $\leq 350\text{bp}$, was etwa 8 *Spa*-Repeats entspricht.

5.2.4 Identifizierung nicht amplifizierbarer Proben

Im Falle wiederholt negativer PCR der X-Region (Ausbleiben von Banden im Agarosegel) wurde zur Diagnose der Erregerart auf ein miniaturisiertes Identifizierungssystem (BBL Crystal™ Testsystem zur Identifizierung grampositiver Bakterien) zurückgegriffen, welches modifizierte konventionelle, fluorogene und chromogene Substrate verwendet.

5.2.5 Aufreinigung der Amplifikate

Sofern die Kontrolle im Agarosegel das Vorhandensein von PCR-Produkten bestätigte, waren die Amplifikate mittels QIAgen-Kit (QIAquick® PCR Purification Kit) aufzureinigen. Nach Zupipettieren von 5 Volumeneinheiten Buffer PB zu einer Volumeneinheit des Amplifikats wurde das Gemisch auf die Säulchen gegeben und 1min bei 15300g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415). Im Anschluss wurde der Durchlauf verworfen, 720µl Buffer PE zugefügt und wieder 1min bei 15300g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs war das Säulchen mit gebundenem Amplifikat eine weitere Minute bei 15300g zu trocknen, in ein neues 1.5ml Tube zu überführen und nach Aufpipettieren von 30µl DEPC Wasser und fünfminütiger Inkubation letztmalig für 1min bei 15300g zu zentrifugieren. Wiederum wurde die DNA-Konzentration photometrisch gemessen, wobei das Mischungsverhältnis von DNA zu Aqua dest. 1:20 betrug. Im Anschluss konnten die Proben entweder weiterverarbeitet oder bei -20°C für maximal 2 Wochen eingefroren werden.

5.2.6 Sequenz-PCR

Zwischen Basenlänge der PCR-Produkte und einzusetzender DNA-Menge besteht folgender Zusammenhang (Abb. 9), um eine optimale Ausbeute an Sequenz-Produkten zu erhalten:

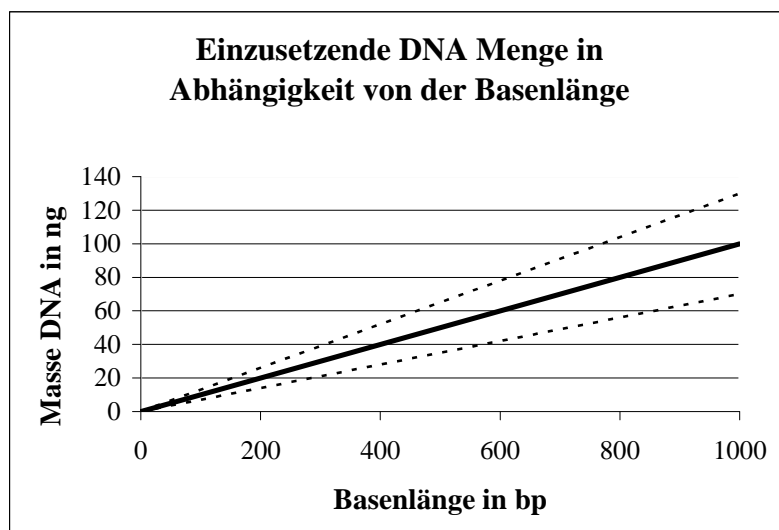


Abb. 9: Einzusetzende DNA-Menge in Abhängigkeit von der Basenlänge des PCR-Produkts (aus DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit, User Manual 2003).

Standardisiert wurden für Basenlängen ≤ 350 bp (entspricht etwa 8 *Spa*-Repeats, vgl. Abb. 8) 40ng DNA, für Basenlängen größer 350bp etwa 60ng DNA eingesetzt. Unter Verwendung der bereits genannten Primer *Spa*-1113-fw sowie *Spa*-1514-rv der Konzentration 5pM wurde das Reaktionsgemisch nach folgendem Ansatz (Tab. 7) angefertigt, wobei jedes einzelne

Template in zwei Tubes mit Forward- beziehungsweise Reverseprimer getrennt zu pipettieren war. Anschließend wurde die Sequenz-PCR unter Einstellung der angegebenen Parameter (Tab. 8) gestartet.

Tab. 7: Für die Sequenz PCR verwendete Reagenzien. Die Gesamtmenge je Ansatz betrug 20µl.

Reagenz	Menge je Probe in µl
Dye Terminator	6
<i>Spa</i> -1113-fw/ <i>Spa</i> -1514-rv, 5pM	1
Template 40ng/60ng	x
DEPC Wasser	13 – x

Tab. 8: Temperaturprofil für die Sequenz-PCR.

Temperatur in °C	Zeit in min : s		Zyklenanzahl
94	0 : 20	Denaturierung	} 30
60	3 : 00	Annealing, Kettenabbruch	
4	∞	Reaktionsstopp	1

5.2.7 Aufreinigung der Sequenz-PCR-Amplifikate

Zur Aufreinigung der Sequenzprodukte wurden Säulchen der Firma Princeton (CENTRI SEP Spin Columns) verwendet. Um diese zu aktivieren, wurden nach kurzem Umstürzen derselben 800µl DEPC zugegeben, kurz gevortext, um Luftbläschen aus dem Gel zu entfernen, und nach einer halben Stunde Einwirkzeit bei Raumtemperatur die obere und untere Verschlusskappe entfernt. Nachdem etwa 250µl Flüssigkeit abgetropft waren, kamen die Säulchen für 2min bei 800g in die Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415) und wurden anschließend in neue 1.5ml Tubes überführt. So präpariert konnten nun die 20µl PCR-Produkt vorsichtig auf das Gel der Säulchen gegeben und weitere 2min bei 800g zentrifugiert werden. Nachfolgend wurde das Eluat circa 35min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 13µl MEGAbace Loading Solution gelöst, für 20s gevortext, kurz anzentrifugiert und anschließend ein Anteil von 11µl auf die Reaktionsplatte (Skirted 96 PCR Plates) pipettiert. Diese konnte entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden.

5.2.8 Sequenzanalyse im MEGAbace Sequenzer 500

Die finale Auswertung der Sequenzreaktion und Digitalisierung der Daten erfolgte im ©Mega BACE™ Sequenzer 500, welcher aus Kostengründen mit nur 48 statt der in der Vollversion (©Mega BACE™ Sequenzer 1000) vorgesehenen 96 Kapillaren ausgestattet war. Hierfür

wurden die Reaktionsplatten nochmals für 1min bei 2000g zentrifugiert (Zentrifuge Hettich Rotanta), um Luftblasen zu entfernen. Gleichzeitig wurde die Gelmatrix für die Kapillaren des Sequenzers 3min bei 800g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415) und anschließend laut Arbeitsanweisung (MeagBACE 1000 Instrument Operator's Guide Version 2.0) weiterverfahren. Die Aufnahme der 48 Proben in die Kapillaren des Sequenzers erfolgte unter Anlegen hoher Spannungen, wobei sich folgende Einstellungen (Tab. 9) bewährt haben:

Tab. 9: Parameter der Sequenzierung mittels MEGAbace Sequenzer 500.

Sample injection voltage	2kV	Sample injection time	85s
Run voltage	6kV	Run Time	120min

Nach Basecalling der Daten wurden die eingelesenen Sequenzen zunächst im Mega BACE™ Sequencing Score Card Programm nach Qualität und Basenlänge ausgewertet, und anschließend mit der Software ©Ridom Staph Type die *Spa*-Typen ermittelt (Abb. 10).

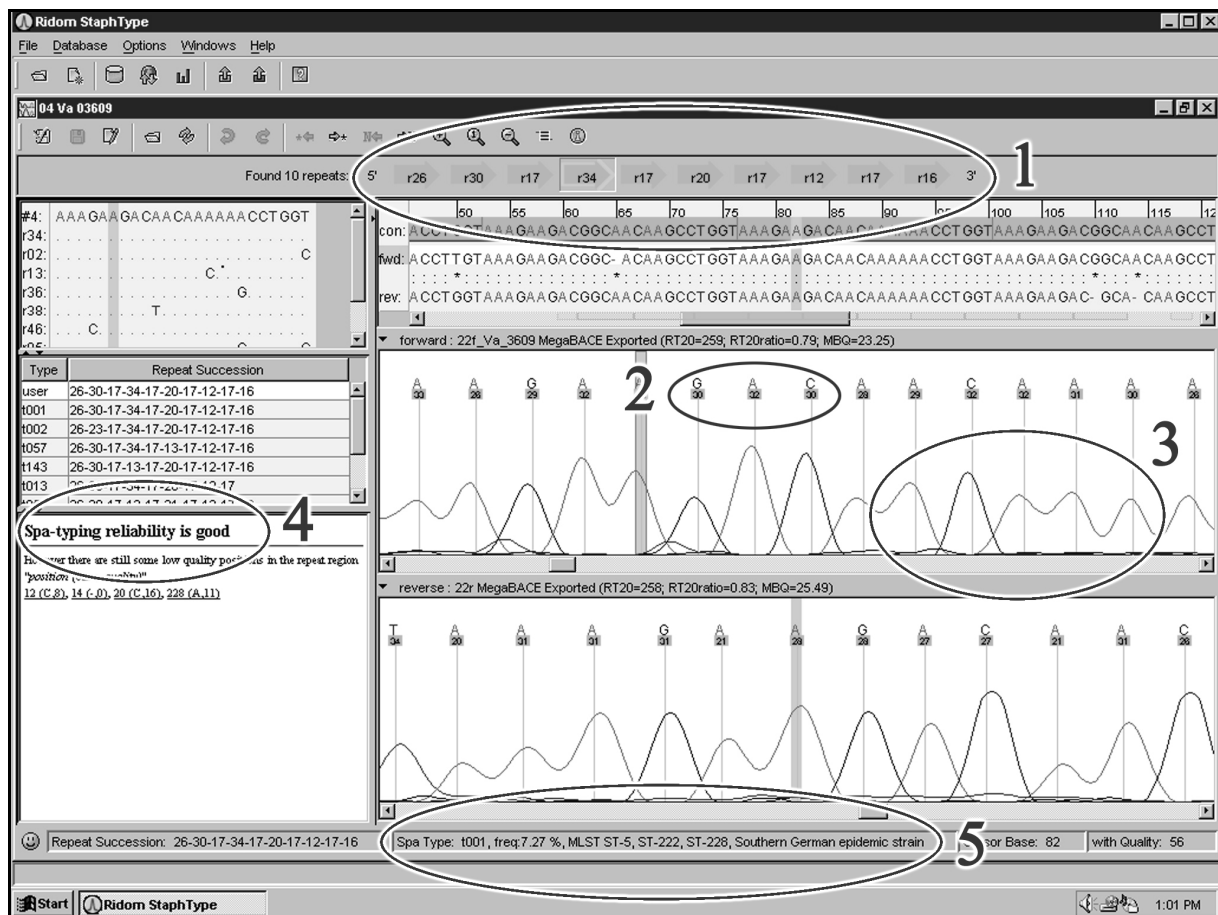


Abb. 10: Auswertung der Sequenzen mittels ©Ridom Staph Type. Das Programm vermittelt Informationen über die Art und Reihenfolge der Repeats (1), die spezifische Abfolge und Fehlerrate der Basen (2, 3), die Qualität der eingelesenen Sequenzprodukte (4) sowie über Art, Häufigkeit und Zuordnung des endgültigen *Spa*-Typs (5).

5.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die folgenden Arbeitsschritte orientierten sich am GenePath® Gruppe 1 Reagenzienkit der Firma Bio Rad.

5.3.1 Stammkultivierung und DNA-Präparation

Für die Kultivierung wurden Einzelkolonien der auf Schafblutagarplatten angezüchteten und ausgewählten Stämme in herkömmliche 10ml Kulturröhrchen überführt und zusammen mit 3ml Nährbouillion bei 37°C unter Schütteln für 16-20h vermehrt. Anschließend wurden 150µl der Bakteriensuspension in ein separates 1.5ml Tube überführt und 2min bei 13400g (Eppendorf Centrifuge 5415) zentrifugiert, so dass nach Absaugen des Überstandes 2-3mm große Pellets am Boden der Reaktionsgefäße verblieben. Nach Zugabe von 150µl Zellsuspensionspuffer wurden die Proben auf 50°C erwärmt und daraufhin 6µl Lysozym/ Lysostaphin (Verhältnis 25:2) sowie 150µl der zuvor im Thermomixer auf 50°C erwärmten Clean Cut Einbettungsagarose zupipettiert. Nach Mischung waren zweimal 100µl der Suspension in die Block-Gießformen zu geben. Ausgehärtet wurden die Gelblöckchen in 2ml Tubes überführt und zusammen mit 0.5ml Lysepuffer I sowie 20µl Lysozym/ Lysostaphin (Verhältnis 25:2) für eine Stunde bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert. Daraufhin wurde der Lysepuffer abgesaugt, mit 1ml 1x Waschpuffer gespült und nach erneutem Entfernen des Überstandes 0.5ml Proteinase K-Puffer sowie 20µl Proteinase K zugegeben. Die Blöcke mussten nun 16-20h bei 50°C inkubiert werden. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und der Waschschrift (Zugabe von 1ml 1x Waschpuffer, Schütteln für 30-60min, Entfernen des Überstandes) 4mal wiederholt, um nach Zupipettieren von 1ml 1x Waschpuffer die Weiterverarbeitung oder Aufbewahrung der Blöckchen bei 4°C zu ermöglichen.

5.3.2 Restriktionsverdau

Nach Überführung der Blöckchen und eines Kontroll-Blocks (*Staphylococcus aureus* NCTC Stamm 8325) in 2ml Mikrozentrifugenröhrchen war 1ml des 1:10 verdünnten 1x Waschpuffers zuzusetzen und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur zu waschen. Anschließend wurde der Waschpuffer abgesaugt und 0.5ml Sma I Puffer zugesetzt sowie 30-60 Minuten inkubiert. Nachdem der Puffer entfernt und 300µl Sma I Puffer zugegeben wurden, mussten 5µl Sma I Restriktionsenzym (25u pro Block) zupipettiert und über Nacht für 16-20 Stunden bei 25°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde der Puffer entfernt und durch 0.5ml 1x Waschpuffer ersetzt, was den Blöckchen eine Haltbarkeit von 2-3 Wochen bei 4°C verlieh.

5.3.3 Gelelektrophorese

Das Agarosegel wurde gemäß den Anweisungen des Gel-Kits hergestellt, so dass 15 Taschen (Wells) zur Probenauftragung bereit standen. Von den fertigen Gelblöckchen waren nun 5mm breite und 2mm hohe Stückchen abzutrennen und nebst des Kontrollstamms und einem Lambda Ladder als Größenstandard in die Vertiefungen zu geben, welche nachfolgend mit leicht schmelzender Agarose aufgefüllt wurden. Anschließend wurde das fertige Gel aus der Halterung genommen und in die Elektrophoresekammer des CHEF-DR™ III eingelegt, welche vorab mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde. Diese Parameter wurden verwendet (Tab. 10):

Tab. 10: Geräteparameter des CHEF-DR™ III für die PFGE (nach Linhardt et al. 1992).

Laufzeit	20h	Finaltime	34.9	Temperatur	14°C
Initialtime	5.3	Volt/cm	6.0	Winkel	120°

5.3.4 Färben und Fotografieren des Gels

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15min in Ethidiumbromidlösung gegeben (5 Tropfen der 1mg/ml Ethidiumbromid Grundlösung + 300ml Aqua dest.) und anschließend für 60min in Aqua dest. entfärbt. Das Ergebnis war mit dem Image Master® System unter UV-Beleuchtung zu fotografieren.

5.3.5 Auswertung des Gels

Die gespeicherten Bilddateien wurden zunächst per Hand, im Anschluss digital (Image Master 1D) ausgewertet. Hierbei unterscheidet man bei der manuellen Auswertung nach Tenover et al. (1995) vier Kategorien von Bandenmustern (Tab. 11), welche zur Klassifizierung der Pulsfeldtypen herangezogen werden. Diese Kriterien werden für Studien empfohlen, deren Umfang ein Jahr nicht überschreitet (Tenover et al. 1995).

Tab. 11: Kriterien der PFGE-Interpretation für Pulsfeldmuster mit ≥ 10 differenzierbaren Restriktionsfragmenten (nach Tenover et al. 1995).

Kategorie	Fragmentunterschiede	Interpretation
Klasse 1	0	Die Bandenmuster der Proben sind identisch und können gleich benannt werden.
Klasse 2	2-3	Die Bandenmuster können als Subtypen bezeichnet werden, die Proben sind eng verwandt.
Klasse 3	4-6	Die Bandenmuster können als Subtypen bezeichnet werden, die Proben sind vielleicht verwandt.
Klasse 4	>6	Die Bandenmuster gehören verschiedenen Stämmen an.

Bei der digitalen Auswertung der Gele mit Hilfe des Programms Image Master 1D wurden zunächst die Bandenmuster der einzelnen Pulsfelder eingelesen, welche anschließend mit dem Pulsfeldmuster eines ausgewählten Referenzstammes verglichen wurden. Die prozentuale Übereinstimmung der Stämme wurde dann in Form eines Dendrogramms dargestellt, welches auf Grundlage der UPGMA-Methode („unweighted pair group method with arithmetic mean“) und des Dice-Koeffizienten (DK) erzeugt wurde. Die prozentuale Übereinstimmung zu vergleichender Pulsfeldtypen mit dem entsprechenden Referenzstamm konnte dann an den jeweiligen Knotenpunkten des Dendrogramms abgelesen werden. Ein Wert von $\geq 80\%$ entspricht hierbei annähernd der Subtypenklassifikation nach Tenover et al. (1995) mit bis zu 6 Bandenunterschieden, und wird daher häufig als „cutoff value“ (Trennwert) für die elektronische Zusammenfassung verwandter Stämme (Klasse 1-3 nach Tenover et al. 1995) benutzt (Mc Dougal et al. 2003, Carriço et al. 2005).

5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte am Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation (IMSID) des Universitätsklinikums Jena mit Hilfe der Software SPSS® für Windows® Version 15.0. Folgende Tests kamen beim Vergleich von Merkmalsausprägungen zum Einsatz, wobei Ergebnisse auf dem 5%-Niveau ($\alpha = 0.05$, p-Wert ≤ 0.05) als signifikant angesehen wurden (Tab. 12):

Tab. 12: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Testverfahren. MA = Merkmalsausprägung, PFGE = Pulsfeld-Gelelektrophorese, ST = *Spa*-Typisierung.

Test	MA	Anwendung bei	Konfidenzintervall
Chi ² -Test	nominal, zwei Ausprägungen	Abb. 11 Abb. 14 Abb. 21 Geschlechtsverteilung MRSA vs. MSSA	Wilson Prozedur mit Kontinuitätskorrektur (nach Newcombe 1998)
		Abb. 12 Abb. 13	nicht erforderlich
Cohen's Kappa (κ)	nominal, zwei Ausprägungen	Konkordanz zwischen PFGE & ST	nicht erforderlich
Diversitätsindex (nach Hunter und Gaston 1988)	nominal, mehrere Ausprägungen	Diskriminations- vermögen PFGE & ST	(nach Grundmann et al. 2001)
Odds Ratio	nominal, zwei Ausprägungen	Geschlechts- und Altersverteilung MRSA vs. MSSA	SPSS® für Windows® Version 15.0
Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	metrisch, diskrete Ausprägung	Altersverteilung MRSA vs. MSSA	nicht erforderlich

6 Ergebnisse

6.1 Probenzusammensetzung

Im Jahr 2004 wurden 214 MRSA-Isolate am Institut für Medizinische Mikrobiologie gewonnen, wovon 41 (19.2%) aus dem Rudolf-Elle-Krankenhaus in Eisenberg und 173 (80.8%) aus dem Klinikum Jena stammten (Gesamtübersicht Anhang 10.2.). Fünf (2.3%) der Proben ergaben keine verwertbaren *Spa*-PCR-Amplifikate, und wurden nach Zuordnung zur Spezies *Staphylococcus haemolyticus* sowie *Staphylococcus saprophyticus* (BBL Crystal™ Testsystem) von der Studie ausgeschlossen (siehe Anhang 10.2). Unter den verbleibenden 209 Einsendungen wurden 201 (96.2%) aus Nasen-, Wund-, Rachen-, Endotracheal-, Haut- und Vaginalabstrichen, Sputen, Blut- und Urinkulturen, Stuhlproben sowie sonstigen Medien (Aszites, Pleurapunktat) von insgesamt 151 Patienten gewonnen, da auch Mehrfachbestimmungen desselben Probanden im Abstand von maximal 288 Tagen in die Untersuchung miteinbezogen wurden (23 Zweifachisolate, 9 Dreifachisolate, 1 Fünf- bzw. Sechsfachisolat). Jeweils vier (1.9%) der verbleibenden acht Einsendungen stammten von Hygieneuntersuchungen innerhalb des Klinikums Jena sowie von Mitarbeitern des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg, die im Rahmen eines Screenings als MRSA-Träger identifiziert wurden. Die Geschlechtsverteilung der 151 Patienten betrug männlich zu weiblich 62.9% zu 37.1%, wobei das Alter zwischen 18 und 89 Jahren lag (Median = 67 Jahre, Mittelwert 64.2 Jahre, Berechnung laut Eingang des Erstisolates). Bezüglich der Geschlechtsverteilung ergab sich ein deutlicher, wenngleich nichtsignifikanter Unterschied ($p=0.07$, OR 1.39, 95%-KI 0.98-1.96) gegenüber derjenigen aller MSSA-Patienten desselben Zeitraums ($N=1437$, männlich zu weiblich 55% zu 45%), welche als Vergleichsgruppe dienen. Das Durchschnittsalter der MRSA-Kohorte war gegenüber demjenigen der MSSA-Patienten (Median = 55J, Mittelwert = 48.9J) signifikant erhöht ($p<0.001$).

6.2 Ergebnisse der *Spa*-Typisierung

Die 209 zu untersuchenden Proben konnten mit Hilfe der *Spa*-Typisierung vollständig analysiert werden. Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 22 verschiedene *Spa*-Typen mit 3 bis 17 Repeats (Median = 10 Repeats) ermittelt, von denen einer (tx374) bislang noch nicht beschrieben wurde (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007, Tab. 13). Zwei (28.6%) von insgesamt sieben ermittelten *Spa*-Typen des Klinikums Eisenberg fanden sich nur dort, wohingegen 15 (75%) von 20 identifizierten *Spa*-Typen lediglich in den Abteilungen des

Klinikums Jena vorkamen (Tab. 13). Bei den 51 (24.4%) untersuchten Mehrfachisolaten, die unter 209 Einsendungen gesammelt wurden, blieb der *Spa*-Typ stets konstant.

Tab. 13: Im Jahr 2004 am Klinikum Jena und Eisenberg ermittelte *Spa*-Typen (ST), SRF = *Spa*-Repeatfolge, AE = Anzahl der Erstisolate, KJ = Klinikum Jena, REK = Rudolf-Elle-Krankenhaus. tx374: noch nicht beschriebener ST (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007).

ST	SRF	AE	Vorkommen
t001	26-30-17-34-17-20-17-12-17-16	29	KJ, REK
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	2	KJ
t003	26-17-20-17-12-17-17-16	31	KJ, REK
t004	09-02-16-13-13-17-34-16-34	17	KJ, REK
t007	15-12-16-16-16-16-02-25-17	1	KJ
t008	11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	1	KJ
t032	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28	13	KJ
t037	15-12-16-02-25-17-24	1	KJ
t040	09-02-16-13-17-34-16-34	2	KJ
t041	26-30-17-34-17-20-17-34-17-20-17-12-17-16	41	KJ, REK
t113	11-12-12-34-22-24-34-22-33-25	1	KJ
t127	07-23-21-16-34-33-13	1	REK
t294	26-23-23-13-16-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28	1	KJ
t481	26-17-20-17-12-12-17-17-16	1	KJ
t515	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-16-16-28	2	KJ, REK
t535	26-17-16	1	KJ
t688	26-23-17-34-17-16	1	KJ
t820	26-30-30-17-34-17-20-17-12-17-16	1	REK
t885	26-23-23-13-23-31-29-17-25-16-16-28	1	KJ
t1194	04-17-25-16-23-34-50-50-50-17	1	KJ
t3264	08-12-16-34-02-43-34-16-16-02-17-17-16	1	KJ
tx374	26-30-17-34-17-20-17-34-17-20-17-12-12	1	KJ

6.2.1 Gesamtverteilung der *Spa*-Typen

Zu den fünf häufigsten Typen unter 151 Patientenerstisolaten zählten Typ t041 (27.2%, „Süddeutscher MRSA-Subklon“), Typ t003 (20.5%, „Rhein-Hessen MRSA-Subklon“), Typ t001 (19.2%, „Süddeutscher MRSA-Subklon“), Typ t004 (11.3%, „Berlin-MRSA-Subklon“) sowie Typ t032 (8.6%, „Barnim MRSA“, Abb. 11). Der Anteil anderer *Spa*-Typen betrug 13.2% (Abb. 11). Dominierender Stamm am Rudolf-Elle-Krankenhaus war mit 67.7% der Typ t041 („Süddeutscher MRSA-Subklon“), dessen Anteil im Vergleich zu den Abteilungen des Klinikums in Jena signifikant erhöht war (95%-KI 49.4-82%, $p < 0.001$). Demgegenüber stellte der Typ t003 („Rhein-Hessen MRSA-Subklon“) mit 25.7% den meistgefundenen *Spa*-Typ am Klinikum Jena dar, was ebenfalls einer signifikanten Häufung (95%-KI 18.2-34.7%,

$p=0.007$) im Vergleich zur Klinik in Eisenberg entspricht. Ansonsten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede auf dem 5%-Niveau ($\alpha = 0.05$) in der *Spa*-Typen-Häufigkeitsverteilung zwischen beiden Einrichtungen.

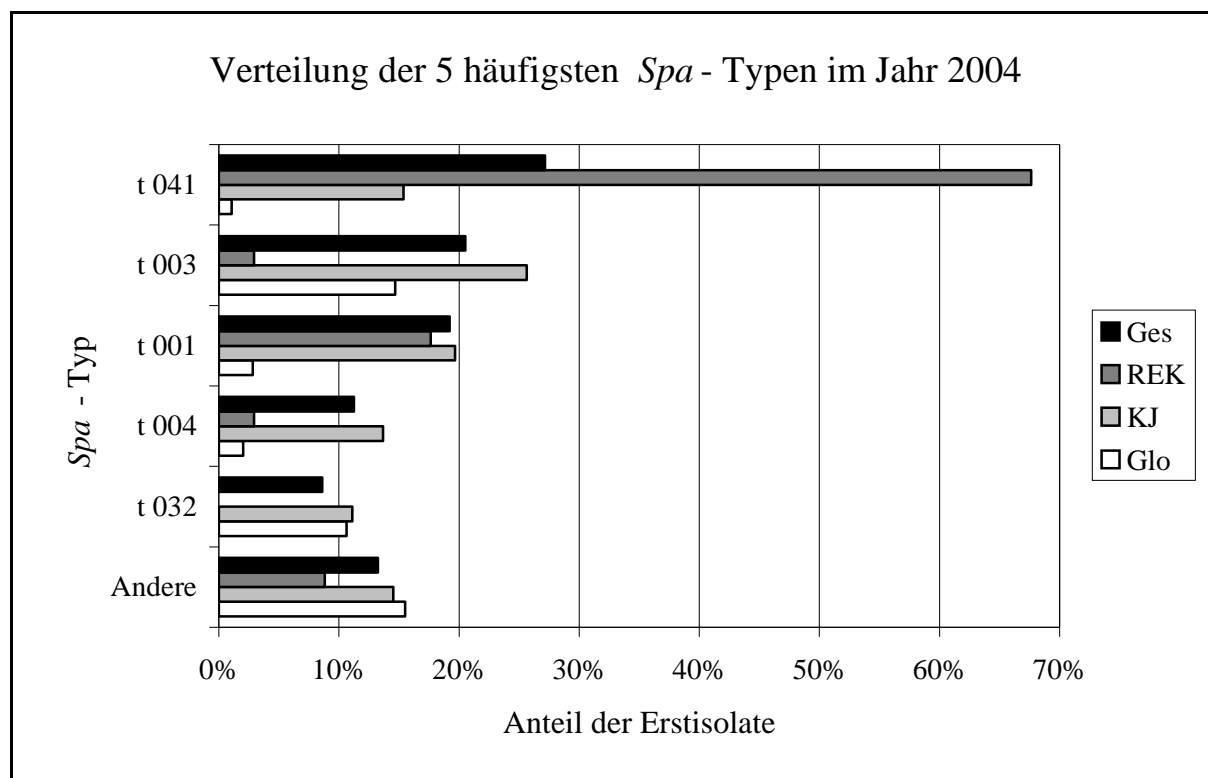


Abb. 11: Verteilung der fünf häufigsten *Spa*-Typen (ST) unter 151 Patientenerstisolate 2004. Ein signifikanter Unterschied der *Spa*-Typenverteilung zwischen REK und KJ ergab sich für Typ t041 ($p<0.001$) und Typ t003 ($p=0.007$), nicht jedoch für die Typen t001 ($p=0.814$), t004 ($p=0.121$) sowie t032 ($p=0.074$). Ges = Anteil an Gesamtzahl (151) der Isolate, REK = Anteil an Gesamtisolate (34) des Rudolf-Elle-Krankenhauses, KJ = Anteil an Gesamtisolate (117) des Klinikums Jena, Glo = Globaler Anteil des ST (Ridom Spa Server, Zugriff 01.10.2007).

6.2.2 MRSA-Anteil und *Spa*-Typenverteilung einzelner Fachgebiete

Die 151 eingesandten Erstisolate stammten von 12 Fachdisziplinen des Universitätsklinikums Jena sowie 4 Fachabteilungen des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg. Die Kliniken mit dem höchsten MRSA-Anteil waren in Jena die Urologie (15.8%), die Abteilung für Intensivmedizin (15.3%) sowie die Chirurgie (11.5%). In Eisenberg hatte die Abteilung für Intensivmedizin den höchsten MRSA-Anteil (54.5%), gefolgt von der Chirurgie einschließlich Orthopädie (27.7%) sowie der Abteilung für Innere Medizin (13.6%). Bezogen auf den Anteil aller *Staphylococcus aureus*-Erstisolate (EI) des Jahres 2004 betrug die MRSA-Rate unter den Patienten am Klinikum Jena 7.9% (117 MRSA auf 1476 *Staphylococcus aureus*-EI), am Rudolf-Elle-Krankenhaus 27.6% (34 MRSA auf 123 *Staphylococcus aureus*-EI, Tab. 14).

Tab. 14: Absolute Häufigkeit der MRSA/ MSSA Isolate sowie MRSA-Anteil (MA) ausgewählter Kliniken in %. Klinikum Jena: Chi = Chirurgische Klinik, Der = Dermatologie, HNO = Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Inn = Innere Medizin, ITS = Intensivstationen, Uro = Urologie, And = Andere. Rudolf-Elle-Krankenhaus: RK Chi = Chirurgische Klinik, RK Inn = Innere Medizin, RK Ort = Orthopädie, RK ITS = Intensivstation.

	Chi	Der	HNO	Inn	ITS	Uro	And	RK Chi	RK Inn	RK ITS	RK Ort
MRSA	29	10	5	22	35	6	10	10	3	6	15
MSSA	224	288	60	198	194	32	315	9	19	5	56
MA %	11.5%	3.4%	7.7%	10.0%	15.3%	15.8%	3.1%	52.6%	13.6%	54.5%	21.1%

Signifikante Unterschiede in der Verteilung einzelner *Spa*-Typen zwischen verschiedenen Fachabteilungen ergaben sich für den *Spa*-Typ t001 ($p=0.011$), t003 ($p=0.004$) sowie t041 ($p<0.001$). Dies äußerte sich insbesondere am Krankenhaus in Eisenberg, da hier der Typ t041 auf den Abteilungen der Chirurgie, Inneren Medizin und Intensivmedizin besonders stark vertreten war (Abb. 12).

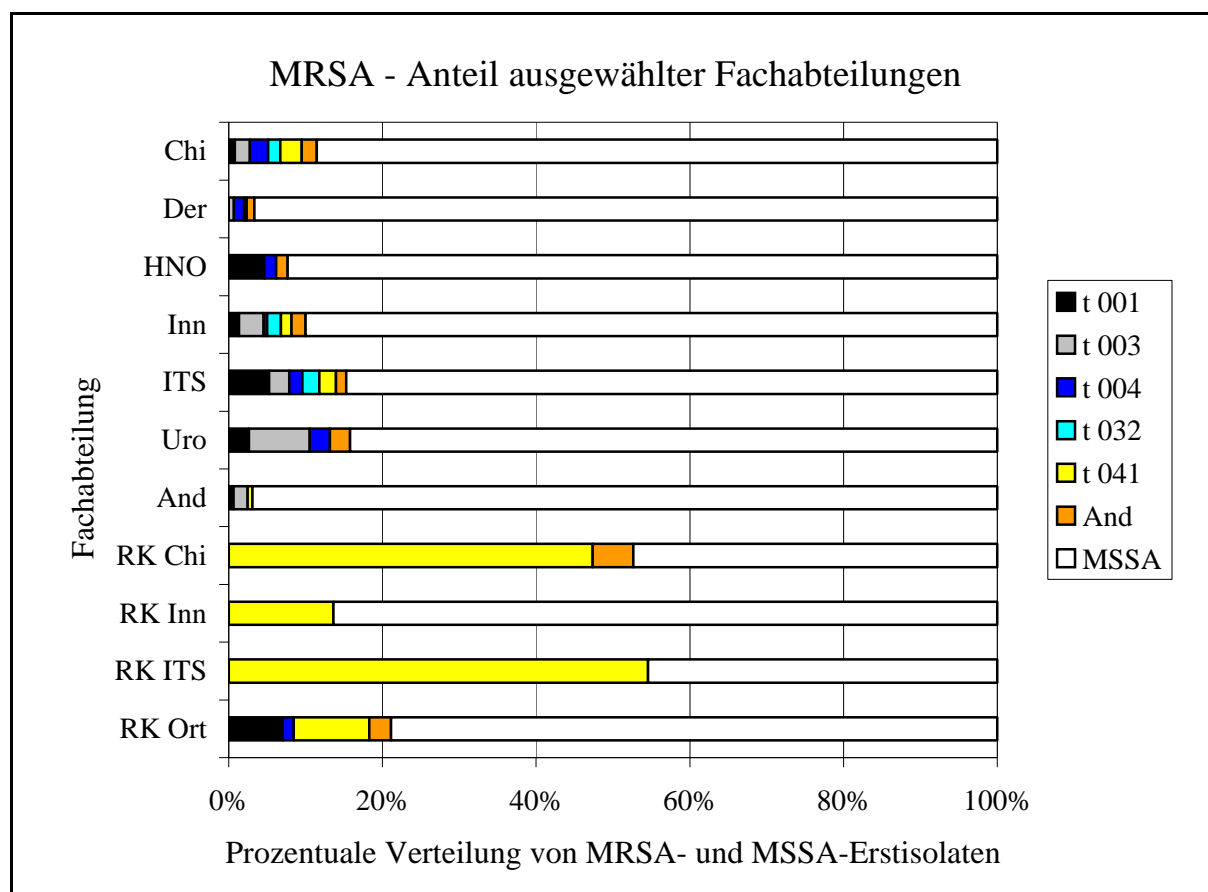


Abb. 12: Übersicht zu MRSA-Anteil und *Spa*-Typenverteilung ausgewählter Fachabteilungen 2004. Signifikante Unterschiede in der Verteilung einzelner *Spa*-Typen (ST) ergaben sich für den *Spa*-Typ t001 ($p=0.011$), t003 ($p=0.004$) sowie t041 ($p<0.001$), nicht aber für die Typen t004 ($p=0.113$) und t032 ($p=0.329$). And = Andere ST. Klinikum Jena: Chi = Chirurgische Klinik, Der = Dermatologie, HNO = Hals-Nasen-Ohren-Klinik, Inn = Innere Medizin, ITS = Intensivstationen, Uro = Urologie, And = Andere. Rudolf-Elle-Krankenhaus: RK Chi = Chirurgische Klinik, RK Inn = Innere Medizin, RK Ort = Orthopädie, RK ITS = Intensivstation.

6.2.3 Zusammenhang zwischen *Spa*-Typ und Entnahmestelle

Die 151 untersuchten Erstisolate entstammten 11 verschiedenen Entnahmearten. Hierbei wurden einige Entnahmestellen als Gruppe zusammengefasst (z.B. Abstrich von Wunde und Kopfwunde als „Wundabstrich“). Am häufigsten wurden Erreger aus Wundabstrichen (37.7%), Trachealsekret (13.2%) sowie Bronchiallavagen, Nasenabstrichen beziehungsweise Urinpräparaten (jeweils 7.9%) gewonnen (Abb. 13). Die Verteilung der fünf häufigsten *Spa*-Typen (vgl. Abb. 11) unter diversen Entnahmearten war relativ homogen (Abb. 13), zumal sich keine signifikante Häufung eines Stammes für eine bestimmte Kategorie feststellen ließ.

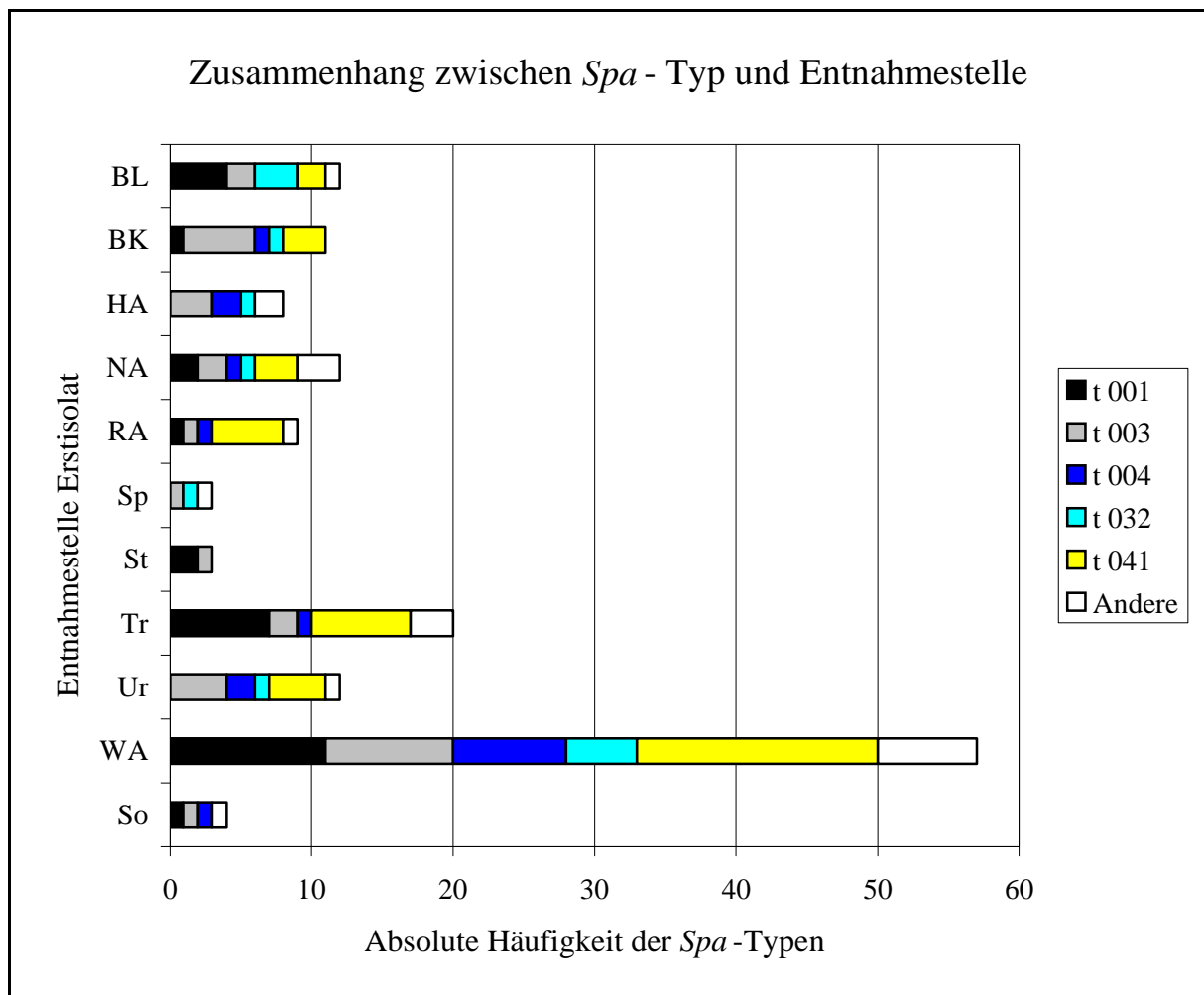


Abb. 13: Anteil der 5 häufigsten *Spa*-Typen (t001-t041) an diversen Entnahmearten 2004. Signifikante Unterschiede in der Typenverteilung unter verschiedenen Entnahmearten ergaben sich weder für den Stamm t001 ($p=0.100$), noch t003 ($p=0.413$), t004 ($p=0.807$), t032 ($p=0.403$) oder t041 ($p=0.274$). BL = Bronchiallavage, BK = Blutkultur, Ha = Hautabstrich, NA = Nasenabstrich, RA = Rachenabstrich, Sp = Sputum, St = Stuhl, Tr = Trachealsekret, Ur = Urinproben (nativer Urin, Katheterurin, Blasen Katheterurin), WA = Wundabstrich (Wunde und Kopfwunde), So = Sonstige (Aszites, Pleurapunktat, Vaginalabstrich).

6.2.4 Änderung der *Spa*-Typenverteilung in Jena im Jahresverlauf 2004

Einen weiteren interessanten Aspekt der Untersuchungen stellte der Umzug der chirurgischen Kliniken einschließlich der Klinik für Intensivmedizin (CI) Jenas aus der Bachstrasse in das neugebaute Klinikum im Stadtteil Lobeda dar, welches seit langem Sitz der Klinik für Innere Medizin (IM) war. Da sich die Häufigkeit der einzelnen *Spa*-Typen in den beiden Institutionen (CI vs. IM) bis dato unterschied, wenngleich nicht signifikant, sollte herausgefunden werden, inwieweit sich die Verteilung nach dem Umzug in den gemeinsamen Klinikneubau veränderte. Als Stichtag für die Zusammenlegung wurde der 27. März 2004 gewählt, da außer der Klinik für Kinderchirurgie bis zu diesem Tag die anderen Abteilungen bereits umgezogen waren. Eine Übersicht zur *Spa*-Typenverteilung der gesammelten Erstisolate vor und nach Umzug gibt Abb. 14.

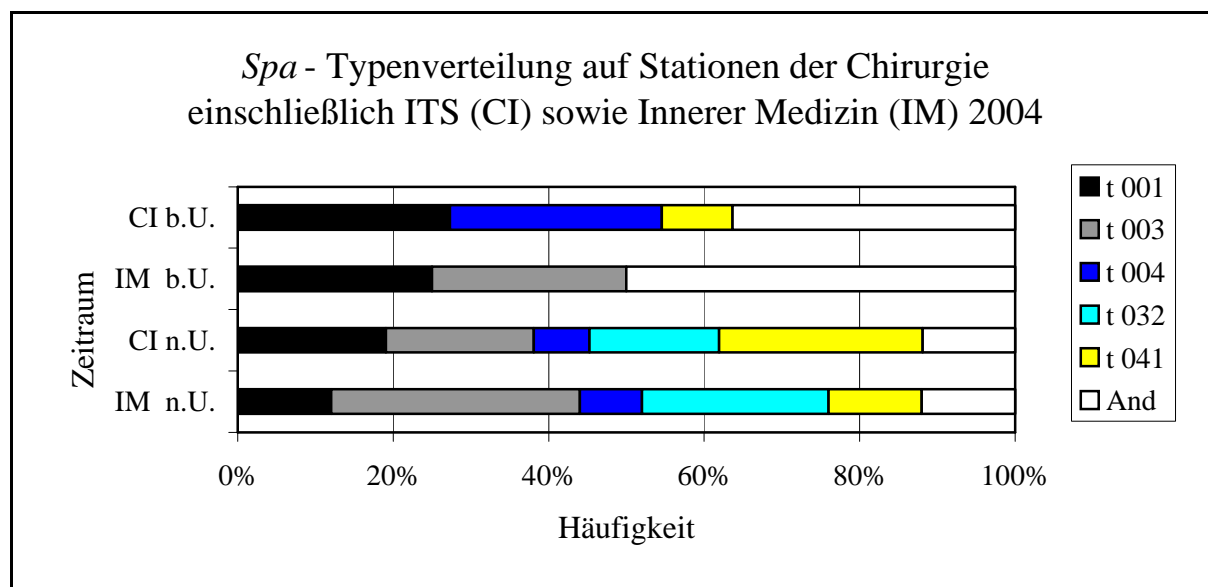


Abb. 14: *Spa*-Typenverteilung (STV) auf Stationen der Chirurgie einschließlich Intensivmedizin (CI) sowie Innerer Medizin (IM) im Jahr 2004. Der Umzug (U) der CI in den Gebäudekomplex der IM war bis 27.03. abgeschlossen. Die STV ist für zwei Zeiträume (b.U. = bis 27.03., n.U. = nach 27.03.) dargestellt. Signifikante Unterschiede in der Verteilung einzelner *Spa*-Typen zwischen oder innerhalb beider Kliniken bestanden weder vor ($p=0.096-1.000$), noch nach dem Umzug ($p=0.222-1.000$) der CI. t001-t041 = häufigste *Spa*-Typen, And = andere *Spa*-Typen.

Die Verteilung eingegangener Erstisolate betrug vor beziehungsweise nach Umzug für die Kliniken der Chirurgie als auch Intensivmedizin 20.8% zu 79.2%, für die Abteilungen der Inneren Medizin 13.8% zu 86.2%. Vor dem Umzug der chirurgischen als auch der intensivmedizinischen Abteilung (CI) stimmte die Häufigkeitsverteilung der *Spa*-Typen nur beim Typ t001 annähernd mit jener der Klinik für Innere Medizin überein. Zwei (t004 und t041) der drei häufigsten *Spa*-Typen im Fachbereich Chirurgie/ Intensivmedizin fanden sich

nur hier, wohingegen einer (t003) der zwei häufigsten Stämme auf den Abteilungen der Inneren Medizin lediglich auch dort präsent war. Im Folgezeitraum (n.U.) erweiterte sich nicht nur das Spektrum der gefundenen *Spa*-Typen in allen Kliniken durch das Neuauftreten des Stamms t032. Der Anteil der fünf häufigsten einschließlich anderer *Spa*-Typen war nun in beiden Gruppen auch etwa gleich groß. Eine signifikante Änderung der *Spa*-Typenverteilung ergab sich weder zwischen den Kliniken, noch innerhalb der beiden Fachabteilungen.

6.2.5 MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus

Im Folgenden wird die MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus näher beleuchtet, da die gewonnenen Daten der *Spa*-Typisierung ein Ausbruchsgeschehen vermuten ließen

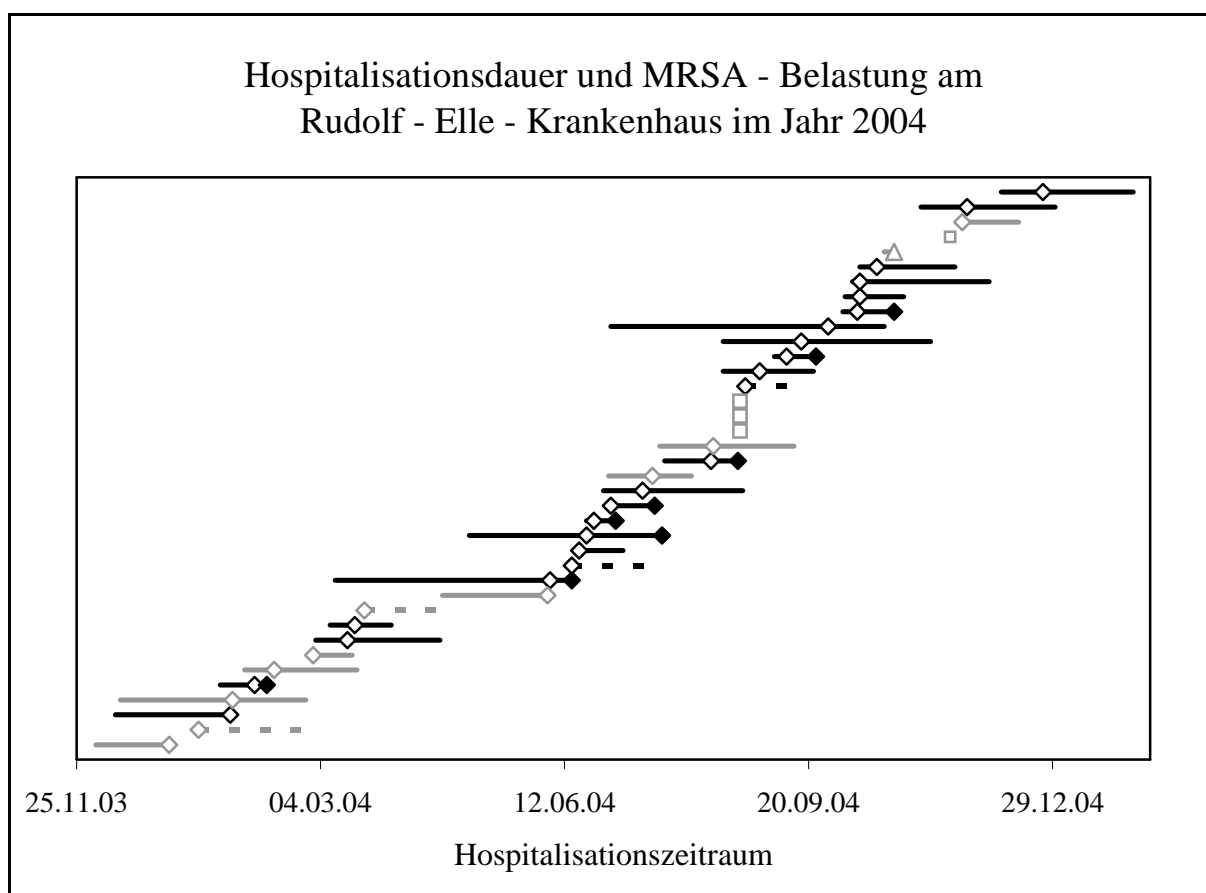


Abb. 15: Synopsis von Hospitalisationsdauer und MRSA-Belastung im Zeitraum 2004 unter 34 Patienten und 4 Mitarbeitern. Die Zeitliche Anordnung erfolgte nach Eingang des Erstisolates (EI), wobei jede Linie dem stationären Aufenthalt eines Patienten entspricht (schwarz unterlegt: *Spa*-Typ t041, grau unterlegt: *Spa*-Typ anders als t041). Quadrat = Personalisolat, helle Raute = EI, dunkle Raute = Tod, Dreieck = EI und Tod fallen auf gleiches Datum, punktierte Linie = Patient wurde bereits MRSA-positiv eingewiesen (EI = Aufnahmedatum).

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 41 MRSA-Isolate typisiert, wovon 3 (7.3%) Doppelisolate desselben Patienten darstellten und weitere 4 (9.8%) von Mitarbeitern des Klinikums stammten. Der Gesamtüberblick (Abb. 15) zur MRSA-Belastung von Patienten

und Mitarbeitern im Jahr 2004 lässt erkennen, dass diese besonders in der zweiten Jahreshälfte 2004 deutlich höher war als zu Beginn des Jahres. Die durchschnittliche Liegedauer aller Patienten betrug 41.8 Tage (Median 35.5 Tage). Die mittlere Dauer bis zur bestätigten Erstinfektion entsprach unter jenen 30 Probanden, bei denen Erstisolation und Aufnahme-datum nicht zusammenfielen, 22 Tage (Median 14.5 Tage). Zwar lässt sich für die Monate Juni/ Juli als auch September/ Oktober eine Häufung der Infektionen mit dem *Spa*-Typ t041 erkennen. Eine genaue Aussage zur Epidemiologie ist jedoch nicht möglich. Hierfür bedarf es der Berücksichtigung des zeitlichen als auch räumlichen Zusammenhangs der identifizierten Stämme (IfSG 2000). Für die Aufdeckung möglicher Übertragungen von MRSA-Infektionen zwischen den Patienten oder dem Personal wurden deren Verweildauer, Aufenthaltsort sowie ermittelter *Spa*-Typ graphisch korreliert (Abb. 16, Gesamtübersicht des Jahres 2004 im Anhang 10.1). Hierbei gilt eine Übertragung dann als wahrscheinlich, wenn der zeitliche und räumliche Kontakt (zweiwöchiges Fenster zwischen Stammsolationen auf gleicher oder benachbarter Station) mit einem MRSA-positiven Träger desselben *Spa*-Typs gegeben war (Mellmann et al. 2006). Derartige Häufungen eines spezifischen Erregers werden auch als Cluster bezeichnet, ohne dass dabei ein Vergleich mit der endemischen Infektionsrate (Baseline) gemacht wird (Ammon et al. 2001). An Hand formulierter Kriterien (Mellmann et al. 2006) konnte im Untersuchungszeitraum für 13 (38.2%) der 34 untersuchten Patienten eine mögliche MRSA-Infektion durch Übertragung nicht ausgeschlossen werden. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Infektionen mit dem *Spa*-Typ t041. Vier (11.8%) Patienten wurden bereits MRSA-positiv aufgenommen, erwarben den Keim also nicht im Krankenhaus. Bei den restlichen 17 (50%) Patienten ist ein Erwerb des Erregers durch Übertragung gemäß den bereits formulierten Bedingungen als unwahrscheinlich anzusehen. Die Mitarbeiter konnten durch die *Spa*-Typisierung als mögliche Übertragungsquelle für MRSA-Infektionen weitestgehend ausgeschlossen werden, da die ermittelten *Spa*-Typen (dreimal t003, einmal t515) in keinem direkten zeitlichen Zusammenhang mit den Patientenisolaten (einmal t003 und t515) standen. Dennoch ist etwa eine gegenseitige Ansteckung der MRSA-Träger gleichen *Spa*-Typs (t003) denkbar, da alle drei Stämme zeitgleich isoliert wurden, obschon der räumliche Zusammenhang nicht ermittelt werden konnte. Nachfolgend (Abb. 16) werden nochmals zwei typische Zeiträume des Jahres 2004 veranschaulicht.

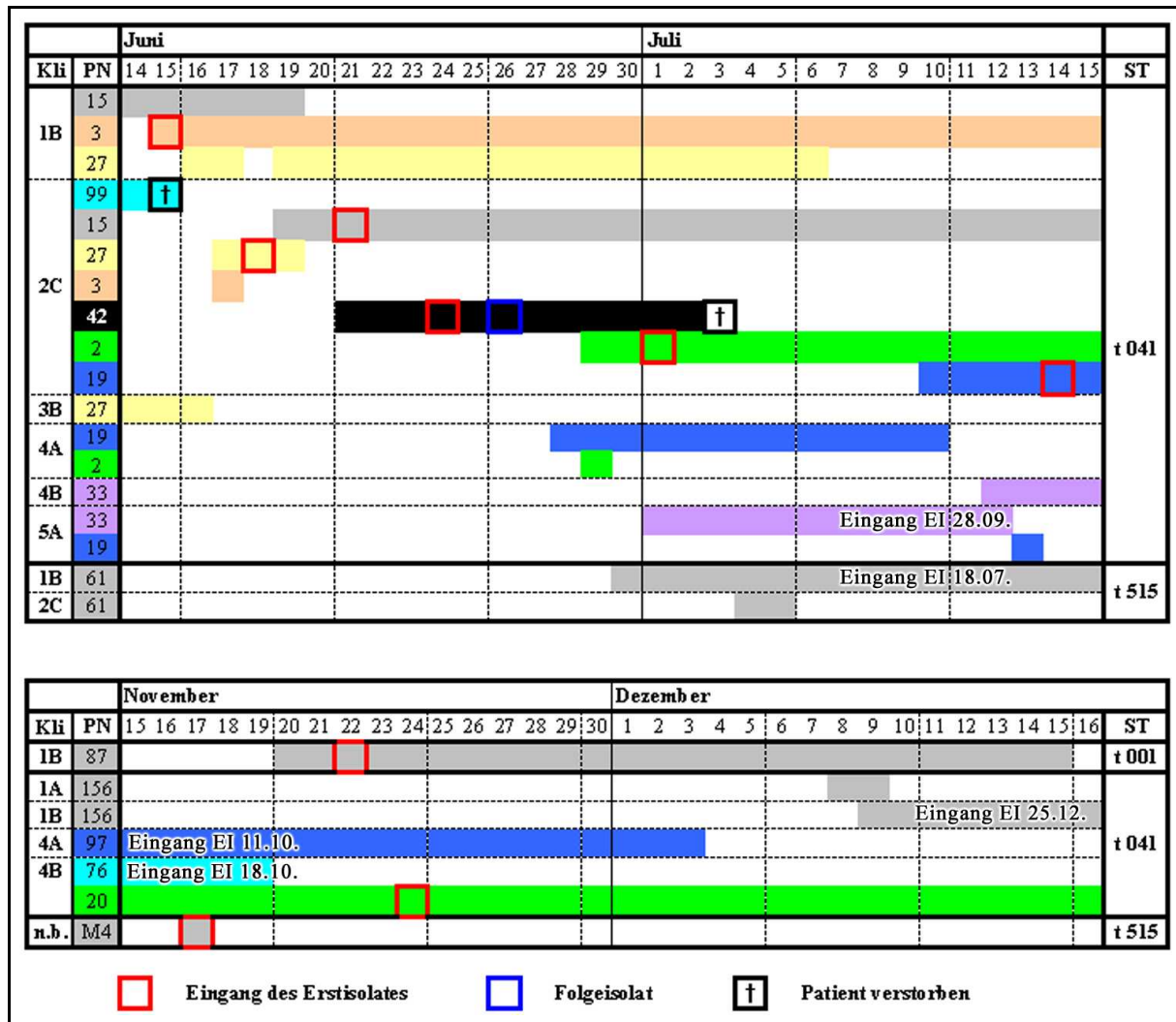


Abb. 16: Grafische Korrelation von Verweildauer, Verweilort und *Spa*-Typ der untersuchten Patienten in zwei ausgewählten Zeiträumen (A: 14.06.-15.07.2004, B: 15.11.-16.12. 2004). Gleiche Patienten sind im zeitlichen Verlauf, getrennt nach *Spa*-Typ, mit gleicher Farbe unterlegt. Eingang des Erstisolates (EI) oder Folgeisolates sowie Tod des Patienten sind hervorgehoben dargestellt. Kli = Klinische Abteilung, PN = Patientenummer, ST = *Spa*-Typ. Abteilung 1A-3B: Orthopädie, Abteilung 2C: Intensivstation, Abteilung 4A/B: Chirurgie, Abteilung 5A/B: Innere Medizin, n.b. = nicht bekannt.

Im Zeitraum A (14.06.-15.07.2004) konnten unter neun Patienten sechs Erstisolate sowie ein Folgeisolat des gleichen *Spa*-Typs t041 ermittelt werden, wobei ein Patient (PN: 3) bereits MRSA-positiv stationär aufgenommen wurde. Ein direkter räumlicher und zeitlicher Kontakt zwischen 6 (66.6%) Probanden (PN: 2, 3, 15, 19, 27, 42) bestand insbesondere auf den Abteilungen 1B (Orthopädie) und 2C (Intensivstation). Daher kann hier von einem klonalen Cluster des *Spa*-Typs t041 gesprochen werden, in dem eine Neuinfektion durch Übertragung des Erregers bei fünf Patienten wahrscheinlich ist. Die Erstisolation des zusätzlichen *Spa*-Typ t515 bei einem Patienten (PN: 61) fand erst im Folgezeitraum statt (18.07.2004, siehe Anhang 10.1). Im Zeitraum B (15.11.-16.12.2004) wurden unter fünf Patienten und einem Mitarbeiter drei Erstisolate unterschiedlichen *Spa*-Typs festgestellt. Der Mitarbeiter kommt als MRSA-

Überträger wahrscheinlich nicht in Frage, da er Träger eines von den Patienten verschiedenen Stammes (t515) ist. Aber auch eine Übertragung zwischen den Patienten 20 und 76, bei denen der gleiche *Spa*-Typ t041 isoliert wurde, ist eher unwahrscheinlich. Zwar hatte Patient 20 vor bestätigter MRSA-Infektion am 24.11.2004 räumlichen Kontakt mit Patient 76. Auf Grund der deutlichen zeitlichen Trennung von mehr als zwei Wochen (Erstisolation bei Patient 76 am 18.10.2004, siehe Anhang 10.1) ist hier aber nicht von einer Ansteckung auszugehen.

6.2.6 Ausbruchsanalyse am Rudolf-Elle-Krankenhaus

Um zu ermitteln, ob das gehäufte Auftreten von MRSA-Isolaten einen Ausbruch darstellt, muss die Definition von Tenover et al. (1995), herangezogen werden: Hiernach ist ein Ausbruch die erhöhte Inzidenz einer Infektionskrankheit an einem bestimmten Ort eines zu betrachtenden Zeitraums, welche über der durchschnittlichen Rate für diesen Ort und Zeitrahmen liegt (Tenover et al. 1995). Zusätzlich sollte ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich sein oder vermutet werden (IfSG 2000), was das Vorhandensein von zwei oder mehr Patienten voraussetzt, die in zeitlichem und räumlichem Zusammenhang (zweiwöchiges Fenster zwischen Stammisolationen auf gleicher oder benachbarter Station) zueinander stehen (Mellmann et al. 2006). Letztere Bedingung wurde im Jahresverlauf nur für den *Spa*-Typ t041 erfüllt (vgl. Anhang 10.1), weshalb allein dieser in die weitere Betrachtung eingeschlossen wird. Wählt man nun unter Berücksichtigung erstgenannter Definition als Terminus „Infektionskrankheit“ die Neuinfektionen mit dem *Spa*-Typ t041 und als Ort die Stationen des Rudolf-Elle-Krankenhauses, so ergeben sich folgende Werte (Tab. 15):

Tab. 15: Inzidenz* des *Spa*-Typ (ST) t041 am Rudolf-Elle-Krankenhaus im Jahr 2004 sowie für zwei ausgewählte Zeiträume (A und B, vgl. Abb. 16). *Quotient aus Neuinfektionen im betrachteten Zeitraum und Anzahl der in dieser Zeit behandelten Patienten, „Inzidenzratio“ = Vielfaches der Inzidenz im betrachteten Zeitraum gegenüber der durchschnittlichen Inzidenz 2004.

Neuinfektionen 2004	Inzidenz 2004	Inzidenz Zeitraum A	Inzidenzratio Zeitraum A	Inzidenz Zeitraum B	Inzidenzratio Zeitraum B
21	0.23%	0.62%	2.7	0.16%	0.7

Die durchschnittliche Inzidenz des *Spa*-Typs t041 im Jahr 2004 betrug unter den 21 Patienten (2 weitere wurden bereits MRSA-positiv eingeliefert) 0.23% (vgl. Tab. 15). Für den betrachteten Zeitraum B (vgl. Abb. 16) lag die Inzidenz mit 0.16% unter dem Ganzjahresdurchschnitt von 0.23%, weshalb hier nicht von einem Ausbruchgeschehen gesprochen werden kann. Im Zeitraum A (vgl. Abb. 16) lag die Inzidenz mit 0.62% jedoch 2.7fach über dem Jahresdurchschnitt von 0.23%, weshalb hier per definitionem ein Ausbruch vermutet werden kann. Durch

Vergleich zwischen monatlicher und durchschnittlicher Inzidenz (Abb. 17) konnten für den *Spa*-Typ t041 die Monate Juni bis Oktober als Zeiträume mit Ausbruchsgeschehen definiert werden. Hierbei wurden drei klonale Cluster (Häufungen) beobachtet, an denen 4 bis 7 Patienten beteiligt waren, wobei nicht in jedem Fall ein direkter räumlicher Kontakt (gleiche oder benachbarte Station) nachweisbar war. Zusätzlich kam es im Monat März, dessen Inzidenz mit 0,22% nur knapp unter der Jahresinzidenz von 0,23% lag, zu einer Clusterung mit zwei Patienten, welche laut Definition (Tenover et al. 1995) jedoch keinem Ausbruch entspricht. Eine Gesamtübersicht der monatlichen Inzidenz im Jahresverlauf gibt Abb. 17.

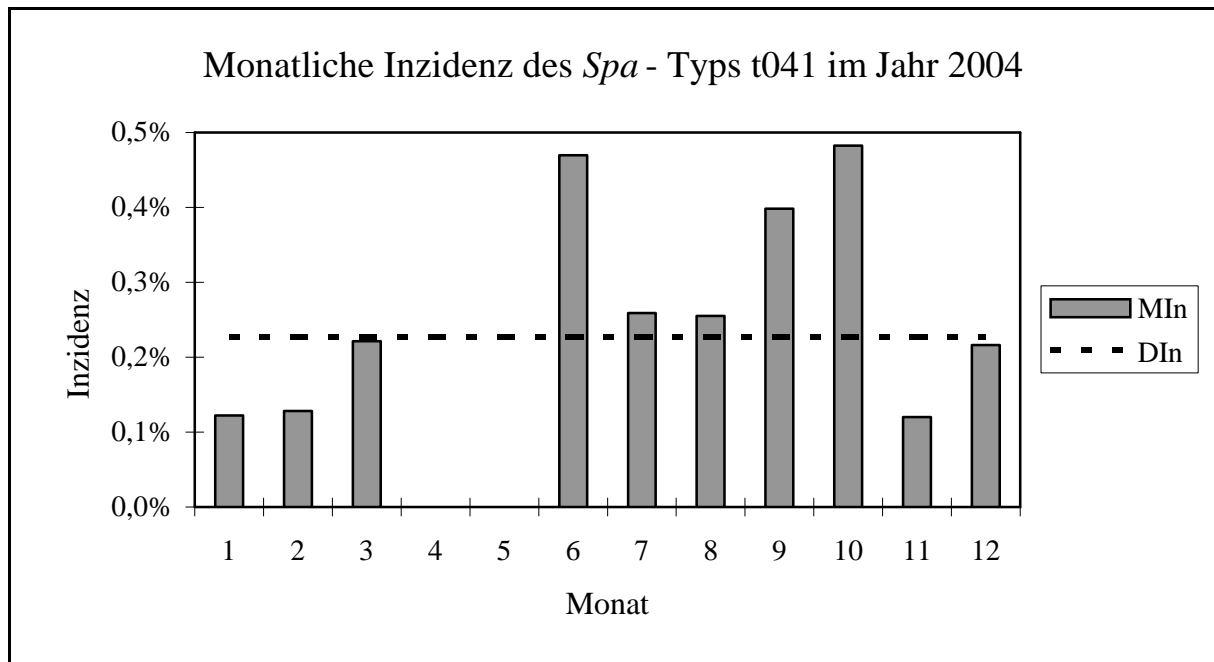


Abb. 17: Monatliche Inzidenz (MIn) des *Spa*-Typs t041 im Jahr 2004. Die durchschnittliche Inzidenz (DIn = 0,23%) des Gesamtzeitraums ist als unterbrochene Linie dargestellt. 1-12 = Januar-Dezember. In den identifizierten Ausbruchsmo-
naten Juni bis Oktober ist MIn > DIn.

6.3 Ergebnisse der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese beschränkte sich auf die eingegangenen Erstisolate des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg im Jahre 2004, welche mit diesem Verfahren allesamt analysiert werden konnten. Von den 38 zu untersuchenden Proben stammten 34 (89.5%) von Patienten gleicher Geschlechtsverteilung im Alter zwischen 24 und 88 Jahren (Median = 73.5 Jahre, Mittelwert 67.8 Jahre, Berechnung laut Eingang des Erstisolats). Weitere 4 (10.5%) konnten von Mitarbeitern des Klinikums im Rahmen eines Screenings isoliert werden. Die einzelnen Stämme sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 16).

Tab. 16: Zusammenstellung der zu typisierenden Isolate. LN = Labornummer, PN = Patientennummer, PFN = Pulsfeldnummer. Fett markiert: Mitarbeiterisolate.

LN	PN	PFN	LN	PN	PFN	LN	PN	PFN	LN	PN	PFN
St 00023-3	49	1	Bk 06436	99	11	Va 15710-1	M2	22	Va 24091	156	32
Va 00852	146	2	Va 10723	3	12	Va 15711-1	M3	23	Va 17713-1	25	33
Va 01597	148	3	Va 10939	27	13	Va 15720-2	M1	24	Va 18508-2	33	34
Va 01760	88	4	Va 11031	15	14	Va 05350-1	85	25	Va 19307	121	35
Va 02462	102	5	Va 11420	43	16	Va 22457-1	20	26	Va 19357-1	58	36
Va 02956	17	6	Va 11818-3	2	17	Va 22285-1	87	27	Va 19408-1	97	37
Va 04126-2	123	7	Mr 00273	M4	18	Va 12782-2	19	28	Va 19887-1	76	38
Va 05038-2	94	8	Va 13079	61	19	Va 15924-1	142	29	Va 20493	83	39
Va 05631	134	9	Va 14937-1	95	20	Va 16349	151	30			
Va 07720	152	10	Va 15011	22	21	Va 17148	78	31			

Die drei erhaltenen Pulsfeldgele sind in Abb. 18 zusammengefasst dargestellt.

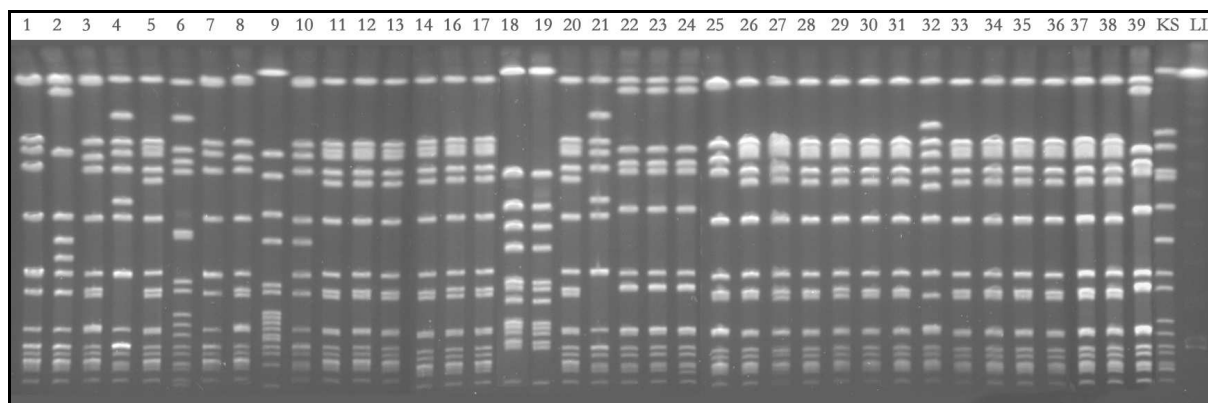


Abb. 18: Ergebnis der PFGE nach digitaler Zusammenlegung aller drei Gele. 1-39 = Pulsfeldnummer (vgl. PFN Tab. 16), KS = NCTC *Kontrollstamm *S. aureus* 8325, LL = Lambda-Größenstandard. *Der Kontrollstamm wurde zur Überprüfung einer adäquaten Aufspaltung der DNA durch das Restriktionsenzym sowie der Reproduzierbarkeit der PFGE mitgeführt.

6.3.1 Manuelle Auswertung der Pulsfeldtypen

Die Klassifizierung der Pulsfeldtypen erfolgte nach manueller Auswertung der Bandenunterschiede gemäß den bereits erläuterten Kriterien (Tenover et al. 1995, Abschnitt 5.3.5). Als Referenzstamm A wurde der am häufigsten vorkommende Pulsfeldtyp (Pulsfeldnummer 5 und weitere) gewählt, welcher allein 20 (52.6%) der 38 Isolate ausmachte. Weitere 7 (18.4%) Proben wurden als vielleicht mit dem Referenzstamm verwandte Stämme A1 bis A4 (4 bis 5 Bandenunterschiede) eingestuft. Die restlichen 11 (32.4%) Isolate wurden als vom Referenzstamm verschiedene Stämme B-G (mehr als 6 Bandenunterschiede) klassifiziert. Insgesamt konnten somit an Hand der verwendeten Kriterien 7 Pulsfeldtypen (A-G) sowie 4 Subtypen (A1-A4) ermittelt werden. Drei der vier vom Personal isolierten Proben (PFN 22, 23 und 24, Pulsfeldtyp C) stimmten mit einem einzigen Patientenstamm (PFN 39) überein, die vierte Probe (PFN 18, Pulsfeldtyp G) war ebenfalls identisch mit dem Pulsfeldtyp eines anderen Patienten (PFN 19, Tab. 17).

Tab. 17: Klassifizierung der Pulsfeldtypen (nach Tenover et al. 1995). PFN = Pulsfeldnummer im Gel, BD = subjektive Bandendifferenz, PT = Pulsfeldtyp. Fett markiert: Mitarbeiterisolate.

PFN	BD	PT	PFN	BD	PT	PFN	BD	PT	PFN	BD	PT	PFN	BD	PT
5	0	A	26	0	A	35	0	A	1	5	A3	39	8	C
11	0	A	27	0	A	36	0	A	7	5	A3	2	10	D
12	0	A	28	0	A	37	0	A	32	5	A4	6	>10	E
13	0	A	29	0	A	38	0	A	4	7	B	9	>10	F
14	0	A	30	0	A	3	4	A1	21	7	B	18	>10	G
16	0	A	31	0	A	8	4	A1	22	8	C	19	>10	G
17	0	A	33	0	A	25	4	A1	23	8	C			
20	0	A	34	0	A	10	4	A2	24	8	C			

6.3.2 Digitale Auswertung der Pulsfeldtypen

Die grafisch-digitale Umsetzung der Klassifikation aller Pulsfeldtypen erfolgte mit Hilfe der Software Image Master 1D. Die prozentuale Übereinstimmung der zu vergleichenden Pulsfeldtypen mit dem gewählten Referenzstamm A konnte nach Dendrogrammerzeugung an den jeweiligen Knotenpunkten desselben abgelesen werden. Sie betrug für die Pulsfeldmuster zwischen $\geq 22\%$ bei verschiedenem Pulsfeldtyp, $\geq 82\%$ bei Subtypen des Referenzstammes und 100% beim Pulsfeldtyp A (Abb. 19). Zum besseren Vergleich der ermittelten Pulsfeld- und *Spa*-Typen wurden letztere bereits in Abb. 19 ergänzt, die vergleichende Auswertung erfolgt allerdings erst im Abschnitt 6.4.1.

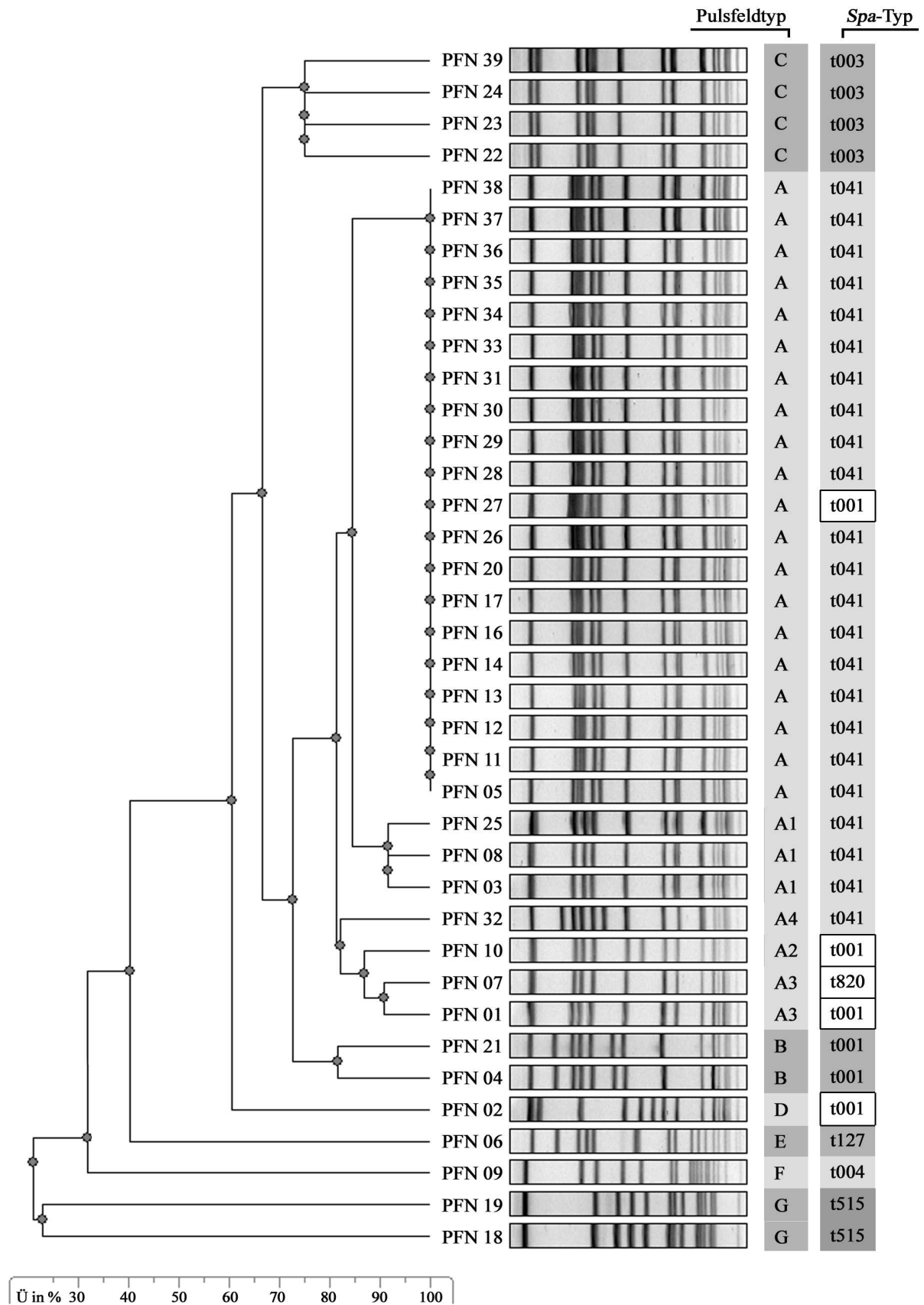


Abb. 19: Dendrogramm der 38 Pulsfeldtypen am Rudolf-Elle-Krankenhaus. Kongruenzen in Pulsfeld- und *Spa*-Typ sind gleichfarbig unterlegt, Unterschiede weiß gekennzeichnet. PFN = Pulsfeldnummer im Gel, Ü = Übereinstimmung mit dem Referenzstamm A.

6.4 Vergleich von Pulsfeld-Gelelektrophorese und *Spa*-Typisierung

6.4.1 Diskriminationsvermögen und Ausbruchsanalyse

Die PFGE ergab 11 verschiedene Pulsfeldmuster, wohingegen die *Spa*-Typisierung bei den vorliegenden Isolaten 6 Gruppen differenzieren konnte. Nach Unterteilung der Pulsfeldtypen in 7 Haupt- und 4 Subtypen (nach Tenover et al. 1995) deckten sich in 33 (86.8%) von 38 Fällen die Ergebnisse der PFGE mit denen der *Spa*-Typisierung. Bei 5 (13.2%) Isolaten stimmten Pulsfeld- und erwarteter *Spa*-Typ nicht miteinander überein (siehe Abb. 19). Hierbei handelt es sich einerseits um mit dem Ausbruchsstamm identische (PFN 27) oder vielleicht verwandte (PFN 1, 7, 10) Proben, welche im Rahmen der Ausbruchsanalyse an Hand des *Spa*-Typs t041 als „nicht am Ausbruch beteiligt“ eingestuft wurden (siehe Abschnitt 6.2.5). Andererseits ergab die *Spa*-Typisierung in einem Fall (PFN 2) keine Auftrennung zweier verschiedener Pulsfeldtypen (B, D) in unterschiedliche *Spa*-Typen. In 2 (5.3%) Fällen zeigte sich bei identischem Pulsfeldtyp ein unterschiedlicher *Spa*-Typ (PFN 7 und 27, Tab. 18). Wird die alleinige Zuordnungsfähigkeit zum Ausbruchsstamm A betrachtet, so betrug die Konkordanz (Reliabilität) beider Verfahren etwa 89.5%, was einer überzufällig starken, signifikanten Übereinstimmung ($\kappa = 0.769$, $p < 0.001$) entspricht.

Tab. 18: Gegenüberstellung von Pulsfeld- und *Spa*-Typ. PFN = Pulsfeldnummer, PT = Pulsfeldtyp, ST = *Spa*-Typ. Fett markiert: Abweichung zwischen PFGE und *Spa*-Typisierung.

PFN	PT	ST	PFN	PT	ST	PFN	PT	ST	PFN	PT	ST	PFN	PT	ST
11	A	t041	20	A	t041	37	A	t041	1	A3	t001	39	C	t003
5	A	t041	29	A	t041	38	A	t041	7	A3	t820	2	D	t001
12	A	t041	30	A	t041	27	A	t001	32	A4	t041	6	E	t127
13	A	t041	31	A	t041	26	A	t041	4	B	t001	9	F	t004
14	A	t041	33	A	t041	3	A1	t041	21	B	t001	18	G	t515
16	A	t041	34	A	t041	8	A1	t041	22	C	t003	19	G	t515
17	A	t041	35	A	t041	25	A1	t041	23	C	t003			
28	A	t041	36	A	t041	10	A2	t001	24	C	t003			

Eine objektive Beschreibung des Diskriminationsvermögens eines Typisierungsverfahrens liefert der so genannte Diversitätsindex (DI, Hunter und Gaston 1988), welcher die Wahrscheinlichkeit beschreibt, dass zwei zufällig ausgewählte Isolate der betrachteten Stichprobe unterschiedlichen Typen zugeordnet werden (Cookson et al. 2007). Je höher also der DI, desto besser ist das Auflösungsvermögen einer Typisierungsmethode. Überlappen sich die Konfidenzintervalle des DI's zweier Verfahren, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide denselben Diversitätsindex besitzen (Faria et al. 2007). Die PFGE ergab für die 38

betrachteten Isolate einen DI von 71.3%. Unter der Bedingung, dass die Subtypen A1-A4 zur Gruppe des Ausbruchsstamms A zählen (Einteilung nach Tenover et al. 1995), verringert sich der Wert auf 48.9%. Für die *Spa*-Typisierung ergab sich am Rudolf-Elle-Krankenhaus ein DI von 60.9%. Bezieht man alle 151 typisierten Isolate (REK und Klinikum Jena) in die Berechnung ein, so beträgt dieser Wert 83.2% (Tab. 19). Nur für diesen letztgenannten Probenumfang ist die Aussage eines signifikant höheren DI's gegenüber den Gruppen „*Spa*-Typisierung“ sowie „Pulsfeldgruppe einschließlich Subtypen“ am Rudolf-Elle-Krankenhaus zulässig, da sich die Konfidenzintervalle in diesem Fall nicht überlappen.

Tab. 19: Auflösungsvermögen der PFGE und *Spa*-Typisierung (ST) laut Diversitätsindex (DI). AI = Anzahl Isolate, AHT = Anteil häufigster Typ, KI = Konfidenzintervall, BDGT = Bandendifferenz gleicher Typ, REK = Rudolf-Elle-Krankenhaus, GES = Gesamtprobensammlung (REK und Klinikum Jena 2004).

Verfahren	AI	AHT in %	DI in %	95%-KI in %
PFGE REK (BDGT = 0)	38	52.6	71.3	56.1-86.4
PFGE REK (BDGT = 1-6)	38	71.1	48.9	29.9-68.0
ST REK	38	60.5	60.9	44.8-76.9
ST GES	151	27.2	83.2	80.3-86.0

6.4.2 Arbeitsaufwand und Kosten der Typisierungsverfahren

Die Zuordnung eingegangener Isolate zur Spezies *Staphylococcus aureus* und die anschließende Resistenzermittlung benötigten unter Verwendung MRSA-selektiven Agars (MRSA Select, Anwendung bei klinischem Verdacht einer MRSA-Besiedlung) 24 Stunden, ansonsten zwischen 48 und 72 Stunden (vgl. Abschnitt 4.1). Lagen die derart isolierten Stämme als Reinkolonien auf Blutagar vor, so verteilte sich der Zeitaufwand für anschließende Typisierungsverfahren unter Berücksichtigung eines maximal achtstündigen Arbeitstages wie folgt: Die Ergebnisse der *Spa*-Typisierung für 24 zu bearbeitende Proben lagen nach 3 Tagen vor. Im Gegensatz hierzu benötigte die Ermittlung der Pulsfeldtypen (einschließlich manueller Bandenauswertung) für 13 zu untersuchende Stämme etwa 5 Tage (Tab. 20). Der tägliche Arbeitsaufwand für die PFGE betrug hierbei nicht mehr als 3 bis 4 Stunden, wohingegen die *Spa*-Typisierung drei komplette Arbeitstage ausfüllte. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Studie teilweise auf eine zeitnahe Analyse einzelner Isolate verzichtet wurde, um vorhandene Kapazitäten (gleichzeitige *Spa*-Sequenzierung von maximal 24 Proben je Reaktionsplatte, Gelelektrophorese von maximal 13 Stämmen je Gel) durch Ansammlung einer ausreichenden Probenanzahl bestmöglich auszunutzen.

Die finanziellen Aufwendungen für beide Verfahren setzen sich sowohl aus den Personal-, Material- als auch Anschaffungskosten der verwendeten Geräte zusammen. Die Personalkosten wurden dabei auf Grundlage des TVöD (Tarifvertrag öffentlicher Dienst) mit 18€ je Stunde für einen Medizinisch-technischen Assistenten beziffert. Die Kosten für verwendete Materialien wurden näherungsweise aus den Listenpreisen der unter 4.3 bis 4.6 genannten und für das jeweilige Verfahren erforderlichen Elemente errechnet. Anschaffungs- beziehungsweise Amortisationskosten eingesetzter Analysegeräte flossen nicht in den ökonomischen Gesamtvergleich beider Verfahren ein, welcher in Tab. 20 zusammengefasst dargestellt ist.

Tab. 20: Ökonomischer Vergleich zwischen *Spa*-Typisierung und PFGE. h = Stunde, d = Tag, MTA = Medizinisch-technischer Assistent, TVöD = Tarifvertrag öffentlicher Dienst. Die Materialkosten errechneten sich aus den Listenpreisen der unter 4.3 bis 4.6 genannten und für das jeweilige Typisierungsverfahren erforderlichen Elemente, und stellen Näherungswerte dar.

Kategorie	<i>Spa</i> -Typisierung	PFGE
Probenanzahl je Run	24	13
Dauer kompletter Run in Tagen	3	5
Arbeitsaufwand (8h/d) je Run in Stunden	24	20
Arbeitsaufwand je Probe in Stunden	1	1.5
Personalkosten MTA nach TVöD (18€/h) je Probe in €	18	27
Materialkosten je Probe in €	17	12
Gesamtkosten je Probe in €	35	39

7 Diskussion

7.1 Probenzusammensetzung

Die Tatsache, dass 5 (2.3%) der 214 eingegangenen Isolate (*Staphylococcus haemolyticus* sowie *Staphylococcus saprophyticus*, siehe Anhang 10.2) fälschlicherweise als MRSA identifiziert wurden, kann mehrere Gründe haben. Einerseits zeigen 11-89% der Stämme von *S. haemolyticus* und *S. saprophyticus* ein pigmenttypisches Kolonienwachstum, welches mit dem von *Staphylococcus aureus* vergleichbar ist (Bannerman und Peacock 2007), was somit möglicherweise zur fälschlichen Vorauswahl dieser Erreger führte. Des Weiteren verfügt der verwendete Agglutinationstest (Slidex ® Staph-Kit, Nachweis von Koagulase, Protein A und/ oder antigenspezifischer Oberflächenproteine über Latexpartikel) zur Identifizierung von *Staphylococcus aureus* lediglich über eine Spezifität von 98.8%, was bedeutet, dass 1.2% der Reaktionen falsch positiv ausfallen. Zudem führen einige Mitglieder der Gattung *S. saprophyticus* und *S. haemolyticus* tatsächlich zu positiven Ergebnissen im Latexagglutinationstest (Personne et al. 1997), welcher zum Nachweis von Protein A und/ oder oberflächenspezifischer Antigene eingesetzt wurde. Der anschließende Einsatz des Slidex ® MRSA-Detection-Kit (Nachweis des PBP2 A) ermöglichte keine weitere Speziesdifferenzierung. Da zwischen 0-7.9% der *S. saprophyticus* Stämme (de Allori et al. 2006, Higashide et al. 2006) und 25.5-80.6% klinischer *S. haemolyticus* Isolate (Kresken et al. 2004, de Allori et al. 2006, Castro et al. 2006) das *mecA*-Gen tragen und somit zur Expression des PBP2 A befähigt sind, werden derartige Proben folglich nicht von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zudem sind falsch positive Ergebnisse trotz einer durch den Hersteller angegebenen Spezifität von 100% theoretisch denkbar. Zuletzt sei noch angemerkt, dass negative Ergebnisse in der *Spa*-PCR, welche in dieser Arbeit erst zur Überprüfung der fünf Stämme führten (BBL Crystal™ Testsystem zur Identifizierung grampositiver Bakterien), auch durch Sequenzmutationen der Primerregion zu Stande kommen können (Koreen et al. 2003).

Das durchschnittliche Alter der 151 Patienten (Median = 67 Jahre, Mittelwert = 64.2 Jahre) war gegenüber demjenigen gleichzeitig eingegangener MSSA-Isolate (N=1437, Median = 55J, Mittelwert = 48.9J) signifikant erhöht ($p<0.001$), was auch andere vergleichende Studien belegen konnten ($p<0.001$, Hallin et al. 2007, Manzur et. al 2007). Die Chance über 60jähriger Patienten, an einer MRSA- statt MSSA-Infektion zu leiden, war dabei 2.84fach gegenüber derjenigen jüngerer Patienten erhöht (OR 2.84, 95%-KI 1.98-4.07). Dies ist insofern nicht verwunderlich, da fortgeschrittenes Alter bekanntermaßen einen Risikofaktor für MRSA-

Kolonisation oder -Infektionen darstellt (Safdar und Maki 2002, Klevens et al. 2007). Zwar sind auch invasive MRSA-Infektionen beschrieben, die hauptsächlich in der jungen Bevölkerung auftreten (Gillet et al. 2002), und seit Ende 2002 auch in Deutschland nachweisbar sind (Witte et al. 2004). Bei den verursachenden Stämmen handelt es sich in der Regel jedoch um Erreger, die unabhängig von Behandlungen in medizinischen Einrichtungen auftreten (cMRSA, Witte und Mielke 2007), was im Rahmen dieser Arbeit auf Grund fehlender Daten nicht weiter eruiert werden konnte. Die Geschlechtsratio (Verhältnis männlich zu weiblich) aller Proben betrug 1.7 (männlicher Anteil = 62.9%) und war damit gegenüber der Ratio der MSSA-Kohorte von 1.2 deutlich erhöht (95%-KI 54.6-70.5%, $p=0.07$, OR 1.39, 95%-KI 0.98-1.96). Bezüglich des Risikofaktors „Geschlecht“ für eine MRSA-Infektion existieren verschiedene Ergebnisse in der Literatur. Fanden Hallin et al. (2007) keinen signifikanten Unterschied in der Geschlechtsverteilung (männlich zu weiblich = 0.8) zwischen MRSA- (N=510) und MSSA-Betroffenen (N=95) unter 605 Patienten ($p=0.15$, Hallin et al. 2007), so war die Inzidenz unter 8987 invasiven MRSA-Infektionen in den USA bei Männern deutlich erhöht (Klevenes et al. 2007). Männliches Geschlecht stellte unter 715 Bewohnern von Altersheimen in Großbritannien ebenfalls einen unabhängigen Risikofaktor einer MRSA-Kolonisation dar (Barr et al. 2007). Demgegenüber ermittelten Manzur et al. (2007) eine Häufung von MRSA-Bakteriämien (N=50) im Vergleich zu MSSA-Bakteriämien (N=98) unter Frauen (OR 2.21, 95%-KI 1.1-4.42, Manzur et al. 2007).

7.2 *Spa*-Typisierung

Wie bereits erwähnt, konnten alle 209 zu untersuchenden Proben mit Hilfe der *Spa*-Typisierung vollständig klassifiziert werden. Die Rate nicht typisierbarer Stämme auf Grund möglicher Sequenzmutationen der Primerregion (Koreen et al. 2003) wird in der Literatur mit etwa 0.1% (Studie an >8000 Isolaten) beziffert (Mellmann et al. 2007). Unter den 22 ermittelten *Spa*-Typen fand sich ein bisher noch nicht beschriebener Erreger (tx374, Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007, vgl. 6.2). Zwar sind bereits mehr als 3000 verschiedene Stämme typisiert worden (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007). Das Potential möglicher Repeatsabfolgen ist damit aber längst noch nicht ausgeschöpft. So berechneten Koreen et al. (2004) die Anzahl denkbarer *Spa*-Typen auf mehr als $3 \cdot 10^{12}$ (Koreen et al. 2004), obwohl mittlerweile mehr als fünfmal so viele *Spa*-Repeats bekannt sind (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007), wie zum damaligen Zeitpunkt. Zudem sei angemerkt, dass gerade einmal 4.7% der mehr als 3000 erfassten *Spa*-Typen eine relative Häufigkeit von mehr als 0.05% aufweisen (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007). Ein Großteil der typisierten Stämme

spielt daher möglicherweise nur auf regionaler oder lokal begrenzter Ebene eine entscheidende Bedeutung für etwaige Ausbruchsgeschehen. Gleiches gilt wohl auch für den von uns gefundenen Typ tx374, welcher lediglich bei einem Patienten nachweisbar war. Inwieweit die Anzahl der *Spa*-Repeats einen Einfluss auf die Verbreitungsfähigkeit der MRSA-Stämme hat, ist umstritten (Montesinos et al. 2002). Die fünf häufigsten in dieser Studie gefundenen *Spa*-Typen, welche allein 86.8% aller Isolate ausmachten, verfügen über 8 bis 16 *Spa*-Repeats. Die 20 global am häufigsten vorkommenden *Spa*-Typen, welche knapp 61% aller bislang analysierten Isolate ausmachen, besitzen zwischen 7 und 16 *Spa*-Repeats (Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007). Ob daraus auf eine Epidemietendenz von Stämmen mit einer Repeatanzahl >7 geschlossen werden kann (Walker et al. 1998), ist jedoch fraglich. Grund hierfür könnte eine bessere Exposition der Fc-bindenden Region des Proteins A mit wachsender Länge der X-Region sein, welche eine Infektion begünstigt (Frénay et al. 1994).

Bei den 51 untersuchten Mehrfachisolaten, welche von insgesamt 34 Patienten gewonnen wurden, konnte keine Veränderung des *Spa*-Typs beobachtet werden. Obwohl derartige genetische Ereignisse in vitro recht selten sind (Koreen et al. 2004), wird die Mutationsrate der X-Region des *Spa*-Gens unter selektivem Druck (z.B. in vivo) mit bis zu 10% aller beobachteten Isolate beziffert (Kahl et al. 2005). Allerdings wurden hierbei Patienten mit zystischer Fibrose und persistierender *Staphylococcus aureus*-Infektion über 41-75 Monate hinweg untersucht. Die Rate eines genetischen Ereignisses (Deletion, Punktmutation etc.) betrug durchschnittlich 70 Monate (Kahl et al. 2005), was bedeutet, dass pro Patient durchschnittlich erst nach dieser Dauer eine Änderung des *Spa*-Typs stattfand. Summiert man die Beobachtungszeiträume aller in unserer Arbeit untersuchten Mehrfachisolate, so ergibt sich lediglich ein Wert von etwa 56.5 Monaten, wobei der Zeitraum zwischen erstem und zuletzt typisiertem Isolat im Einzelnen bei maximal 10 Monaten lag. Über mögliche Begleiterkrankungen liegen keine Angaben vor. Daher war trotz der offensichtlich hohen Mutationsrate von bis zu 10% aller Isolate im Rahmen unserer Studie aus statistischer Sicht eine Änderung des *Spa*-Typs eher nicht zu erwarten.

7.2.1 Verteilung der *Spa*-Typen

Zu den fünf häufigsten *Spa*-Typen zählten im Untersuchungszeitraum Typ t041 (27.2%, „Süddeutscher MRSA-Subklon“), Typ t003 (20.5%, „Rhein-Hessen MRSA-Subklon“), Typ t001 (19.2%, „Süddeutscher MRSA-Subklon“), Typ t004 (11.3%, „Berlin MRSA-Subklon“) sowie Typ t032 (8.6%, „Barnim-MRSA“). Diese Stämme zählten im Jahr 2004 in ganz Thüringen als auch deutschlandweit zu den häufigsten klonalen Linien (RKI 2005). Erreger

der Gruppen „Barnim-MRSA“ (t032) und „Berliner MRSA“ (t004, t026 und t038) finden sich vor allem in der Nordhälfte des Bundesgebietes, MRSA der Gruppe „Rhein-Hessen“ (t003 und t002) werden mittlerweile im gesamten Bundesgebiet isoliert (RKI 2007b). Interessanterweise kam es im Laufe der letzten Jahre zu einer Änderung der Häufigkeit bestimmter klonaler Linien. Während der Anteil des „Süddeutschen“- und „Berliner Epidemiestammes“ seit dem Jahr 2000 rückläufig ist, nimmt die Häufigkeit des „Barnim“- und „Rhein-Hessen-Klons“ stetig zu (RKI 2007b, Abb. 20). Eine derartige Dynamik der *Spa*-Typenverteilung ist auch weltweit zu beobachten. So kam es beispielsweise in Ungarn innerhalb der letzten fünf Jahre zur Verdrängung des dortigen Klons durch den „Süddeutschen“- und „Japan/ New York-MRSA -Epidemiestamm“ (Conceição et al. 2007). In Spanien wurde zwischen 1997 und 2005 eine Verdrängung des „Brasilianischen“- und „Japan/ New York Klons“ zugunsten des „EMRSA-16 Epidemiestamms“ beobachtet (Potel et al. 2007).

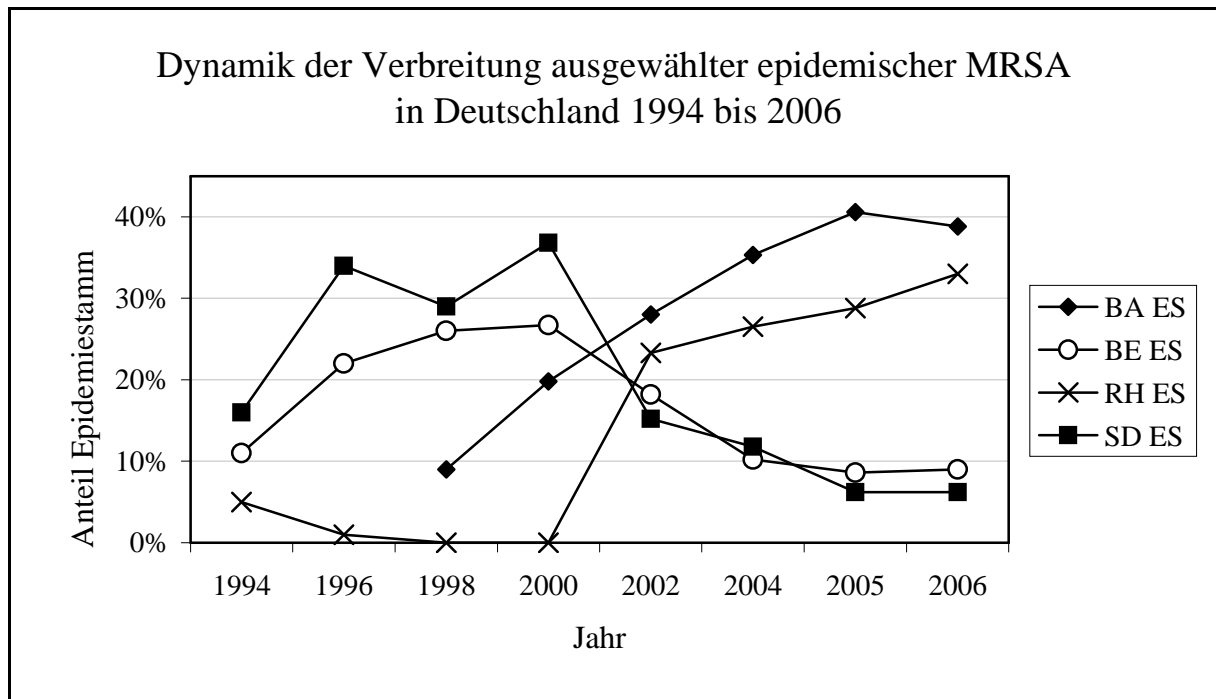


Abb. 20: Dynamik der Verbreitung ausgewählter epidemischer MRSA in Deutschland von 1994 bis 2006, basierend auf Pulsfeld-typisierten Einsendungen an das NRZ (Nationales Referenzzentrum, aus RKI 2007b). ES = Epidemiestamm, BA = „Barnim MRSA“, BE = „Berliner MRSA“, RH = „Rhein-Hessen MRSA“, SD = „Süddeutscher MRSA“.

Die Tatsache, dass ein Vertreter des „Süddeutschen Epidemiestammes“ (t041) am Rudolf-Elle-Krankenhaus in Eisenberg signifikant häufiger ($p < 0.001$), der Typ t003 („Rhein-Hessen MRSA-Subklon“) hingegen signifikant weniger ($p = 0.007$) vertreten war als in den Abteilungen des Klinikums Jena, kann mehrere Gründe haben. Einerseits repräsentiert das Universitätsklinikum mit 1375 Betten und 43793 stationär behandelten Patienten (Universitäts-

linikum Jena 2004) als überregionales Versorgungszentrum einen viel breiteren Bevölkerungs- und somit Erregerquerschnitt als das Krankenhaus in Eisenberg (360 Betten, 9336 stationär behandelte Patienten, Rudolf-Elle gGmbH 2004). Zudem ist durch die vergleichsweise höhere Rate von Patientenverlegungen über den Einzugsbereich hinaus auch ein häufigerer Austausch möglicher MRSA-Stämme denkbar. Eine Übereinstimmung mit der gesamtdeutschen Statistik (vgl. Abb. 20) ist daher am Universitätsklinikum viel wahrscheinlicher, was durch die Tatsache untermauert wird, dass der „Rhein-Hessen MRSA-Subklon“ t003 mit 25.7% hier häufigster *Spa*-Typ war (26.5% im Jahr 2004 bundesweit, RKI 2007b, vgl. Abb. 20). Zudem kam es im Untersuchungszeitraum in Eisenberg zu mehreren Ausbrüchen des Klon t041 (vgl. 6.2.6), die das Verhältnis zugunsten dieser Linie verschoben haben könnten. Möglicherweise handelt es sich bei diesem *Spa*-Typ auch um einen endemischen Stamm des Rudolf-Elle-Krankenhauses (vgl. Lang et al. 2007). Da auch Personen mit unerkanntem Trägerstatus (Pflegepersonal, asymptomatische Patienten) ein Reservoir für Staphylokokken darstellen (RKI 2007a), und der Erreger zudem auf unbelebten Objekten für Monate überleben kann (Kramer et al. 2006), ist eine solche „Zirkulation“ bestimmter Stämme denkbar. Im Rahmen eines Staphylokokkenscreenings am Rudolf-Elle-Krankenhaus unter 1490 Patienten zwischen November 2005 und Mai 2006 konnten insgesamt 15 MRSA-Isolate gewonnen werden (Lang et al. 2007). Keiner der erstmalig in Eisenberg behandelten Patienten präsentierte den *Spa*-Typ t041, wohingegen drei von vier Probanden, die zuvor schon hier betreut wurden, mit diesem infiziert waren. Letztlich wäre eine ständige Surveillance der MRSA-Verteilung auf Basis der *Spa*-Typisierung notwendig, um derartige Vermutungen weiter untermauern zu können. Ergänzend muss erwähnt werden, dass die am häufigsten gefundenen *Spa*-Typen in Eisenberg und Jena dennoch genetisch verwandt sind. Sie werden zum selben klonalen Komplex 5 (CC 5 nach MLST, Ridom *Spa* Server, Zugriff 09.12.2007) gezählt, was letztlich die These stützt, dass die regionale Verbreitung bestimmter MRSA-Linien spezifisch verläuft (Chung et al. 2004).

7.2.2 MRSA-Anteil verschiedener Fachgebiete

Staphylococcus aureus kolonisiert bei etwa 20% der Bevölkerung dauerhaft, bei rund 60% intermittierend die Haut, insbesondere im Bereich des Nasenvorhofs und des Perineums, seltener das Kolon, Rektum und die Vagina (Archer 1998, Foster 2004). Es ist daher einleuchtend, dass insbesondere diejenigen Fachdisziplinen mit Infektionen durch diesen Erreger konfrontiert sind, welche sich mit der iatrogenen oder pathogenetischen Schädigung der physiologischen Körperbarrieren (Haut, Schleimhäute) auseinandersetzen. Das Eindrin-

gen der Erreger in gesundes (Inokulation durch Inzision, Punktion etc. mit medizinischen Geräten) oder vorgeschädigtes Gewebe (postoperative Wunde, Hautkrankheiten etc.) mit anschließender Infektion spielt daher besonders in der Chirurgie, der Intensivmedizin einschließlich Innerer Medizin (RKI 2005) sowie, bis vor einigen Jahren (RKI 2007b), der Dermatologie eine große Rolle. Andererseits sind Kliniken mit hohem Patientenumsatz häufiger mit diesem Problem konfrontiert, da die Wahrscheinlichkeit unerkannter Einschleppung oder Übertragung sowie das Risiko von Kreuzinfektionen mit steigender Patientenzahl zunehmen (Nixon et al. 2006). Am Klinikum Jena wurden im Untersuchungszeitraum 60.8% der Patienten stationär auf den Abteilungen der Inneren Medizin (29.3%), Chirurgie (22.9%) sowie Intensivmedizin (8.6%) behandelt (Universitätsklinikum Jena 2004). In Eisenberg wurden im Jahr 2004 etwa 58% der stationären Fallzahlen allein auf der Klinik für Orthopädie umgesetzt, gefolgt von der Inneren Medizin (22.8%) und Chirurgie (19.9%, Rudolf-Elle gGmbH 2004). Die Kliniken mit dem höchsten MRSA-Anteil waren in Jena die Urologie (15.8%), die Abteilung für Intensivmedizin (15.3%) sowie die Chirurgie (11.5%). In Eisenberg hatte die Klinik für Intensivmedizin den höchsten MRSA-Anteil (54.5%), gefolgt von der Chirurgie einschließlich Orthopädie (27.7%) sowie der Abteilung für Innere Medizin (13.6%). Diese Häufigkeitsverteilung deckt sich am Klinikum Jena zumindest tendenziell mit der bundesweiten Statistik des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2004. Zwischen Rudolf-Elle-Krankenhaus und Universitätsklinikum bestanden hingegen signifikante Unterschiede, besonders auf den Stationen der Chirurgie ($p < 0.001$) und Intensivmedizin ($p = 0.004$, Abb. 21).

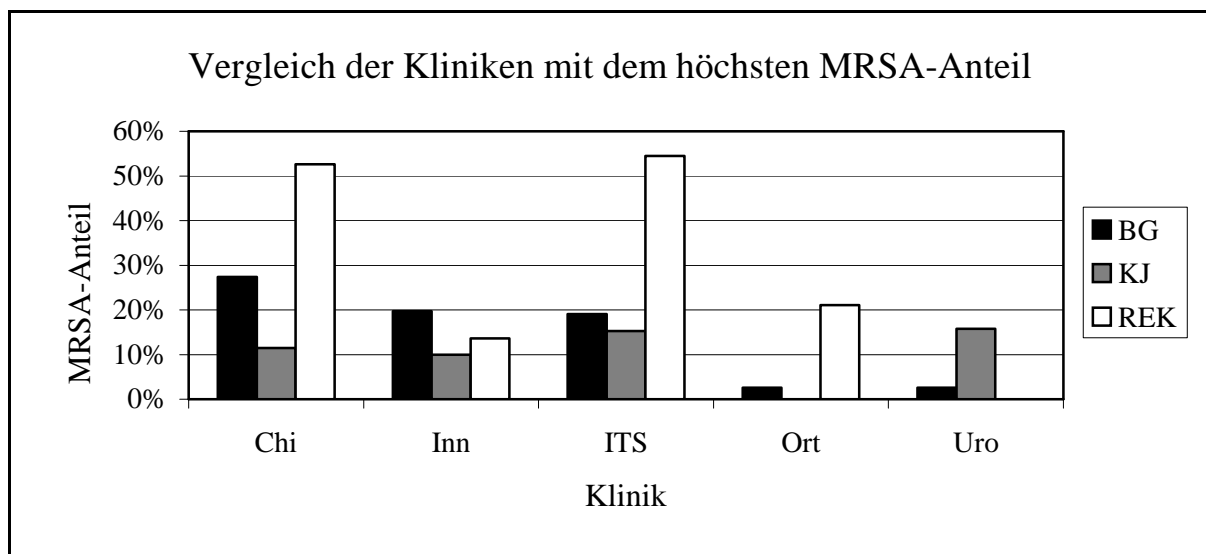


Abb. 21: Vergleich der Kliniken mit dem höchsten MRSA-Anteil 2004 im Bundesgebiet (BG, RKI 2005), am Klinikum Jena (KJ) sowie am Rudolf-Elle-Krankenhaus in Eisenberg (REK). Signifikante Unterschiede des MRSA-Anteils zwischen REK und KJ bestanden auf der Klinik für Chirurgie (Chi, $p < 0.001$) und Intensivmedizin (ITS, $p = 0.004$), nicht aber auf der Klinik für Innere Medizin (Inn, $p = 0.710$). Ort = Orthopädie, Uro = Urologie.

Über den Grund der deutlich erhöhten MRSA-Rate am Rudolf-Elle-Krankenhaus kann nur spekuliert werden. Einerseits wurden im zweiten Halbjahr 2004 Ausbruchssituationen beobachtet (vgl. 6.2.6), welche den MRSA-Anteil ungünstig beeinflussten, der zwischen Januar und Mai mit 22% noch vergleichsweise gering war. Andererseits schlagen bei einer absoluten Fallzahl von gerade einmal 34 MRSA-Isolaten derartige Ereignisse statistisch stärker ins Gewicht als etwa am Klinikum Jena (121 Erstisolate). Beim hieran maßgeblich beteiligten Keim des *Spa*-Typs t041 handelt es sich zudem möglicherweise um einen endemischen Stamm des Rudolf-Elle-Krankenhauses (vgl. Lang et al. 2007), welcher durch unerkannte Persistenz auf unbelebten Objekten oder Pflegepersonal nur schwer zu eradizieren war. Des Weiteren sind sämtliche Abteilungen des Krankenhauses auf nur fünf Etagen eines zusammenhängenden Gebäudekomplexes zu finden, und nicht, wie zum damaligen Zeitpunkt am Klinikum Jena, im Stadtgebiet verteilt. Diese fehlende räumliche Trennung erleichtert die Ausbreitung von Erregern möglicherweise enorm, da ein Austausch von Keimen zwischen Mitarbeitern aber auch Patienten aller Stationen denkbar ist. In den meisten Fällen erfolgt die Übertragung durch die Hände des Pflegepersonals (Kampf und Kramer 2004), wobei gerade unter Ärzten, welche teilweise auch auf mehreren Station tätig sind, die Compliance bezüglich Händedesinfektionsmaßnahmen mit unter 50% besonders gering ist (Pittet 2001). Letztlich ist auch zu berücksichtigen, dass am orthopädischen Zentrum in Eisenberg mehr als 80 septische Gelenksrevisionen durchgeführt wurden (Rudolf-Elle gGmbH 2004), welche häufig primär an anderen Kliniken operiert wurden. Dies führt verständlicherweise zu einer Verschiebung der MRSA-Statistik durch mögliche Keimeinschleppung bereits infizierter Patienten. Zur Limitierung dieses Problems wurde Ende 2004 ein MRSA-Screening eingeführt.

Bezogen auf den Anteil aller *Staphylococcus aureus*-Erstisolate (EI) des Jahres 2004 betrug die MRSA-Rate unter den Patienten am Klinikum Jena 7.9% (117 MRSA auf 1476 *Staphylococcus aureus*-EI), am Rudolf-Elle-Krankenhaus 27.6% (34 MRSA auf 123 *Staphylococcus aureus*-EI). Insgesamt ergibt sich somit für beide Einrichtungen ein MRSA-Anteil von 9.4%, der deutlich unter dem gesamtdeutschen Schnitt von 22.6% des Jahres 2004 lag (Kresken et al. 2004). Die GENARS-Daten (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance 2004) beziffern die MRSA-Häufigkeit am „Zentrum Jena“ auf 10.6% (GENARS 2007). Grund für diesen erhöhten Wert ist wahrscheinlich die Mehrfachvergabe unterschiedlicher Fallzahlen bei gleichem Patienten nach maximal zwölf Wochen, so dass auch Mehrfachisolate desselben Probanden in die Berechnung einfließen können. Einen Überblick zur Entwicklung der Oxacillinresistenz am Klinikum Jena zwischen 2002 und 2006 gibt Abb. 22. Der deutliche Anstieg von 6.9% im Dokumentationszeitraum reflektiert

gleichermaßen den nationalen Trend einer steten Zunahme der MRSA-Prävalenz (Kresken und Hafner 1999).

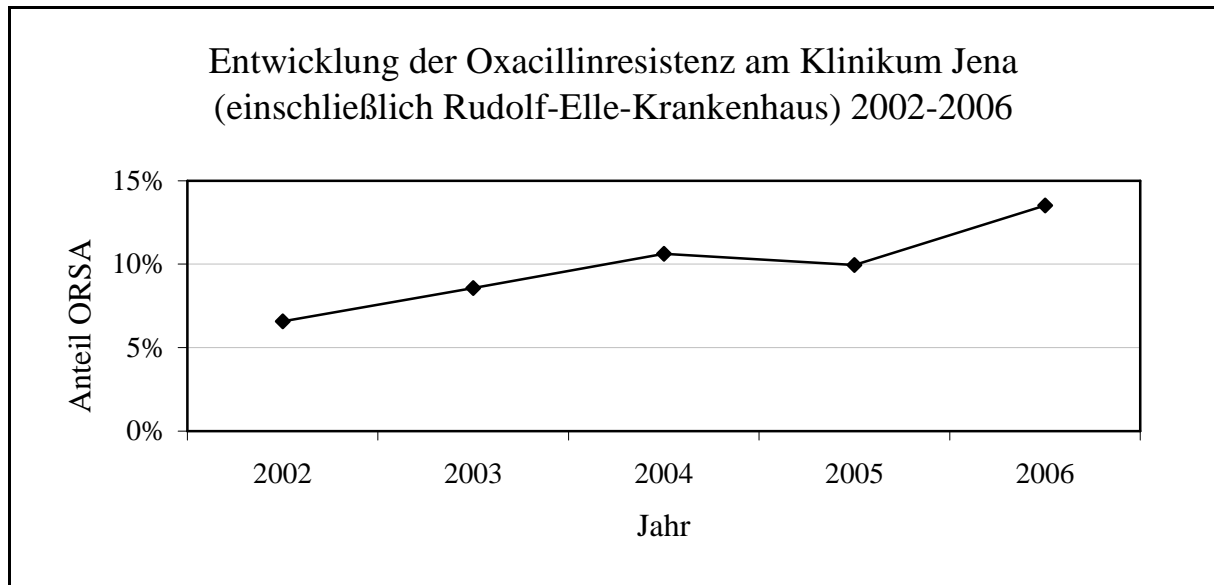


Abb. 22: Entwicklung des Anteils Oxacillinresistenter *Staphylococcus aureus* (ORSA) am Klinikum Jena inkl. des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg 2002-2006 (GENARS 2007).

7.2.3 Zusammenhang zwischen *Spa*-Typ und Entnahmestelle

Staphylococcus aureus ist bekanntermaßen für eine Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich und nicht zuletzt häufigster Verursacher chirurgischer Wundinfektionen (HPA 2006) und krankenhauserworbener Bakteriämien (NINSS 2002). Die Prävalenz verschiedenster Krankheitsbilder spiegelt sich zumindest teilweise in der Zuordnung zu bestimmten Entnahmestellen wider, wie sie für die 151 untersuchten Erstisolate erfolgte. Am häufigsten wurden Erreger aus Wundabstrichen (37.7%), Trachealsekret (13.2%) sowie Bronchiallavage, Nasenabstrichen beziehungsweise Urinpräparaten (jeweils 7.9%) gewonnen (Abb. 13). Diese Verteilung ist auf Grund der physiologischen Besiedlung der Haut sowie der Schleimhäute des Oropharynx (RKI 2007a) durchaus verständlich und lässt auf die Häufigkeit assoziierter Erkrankungen (Wundinfektion, Pneumonie etc., vgl. Tab. 1) schließen. Dieses Bild deckt sich zudem weitestgehend mit Ergebnissen anderer Arbeiten. So isolierten Hallin et al. (2007) unter 510 Patienten MRSA-Stämme vornehmlich aus dem Respirationstrakt (24%), aus Screeninguntersuchungen des Oropharynx (24%) sowie Haut- und Weichteilinfektionen (21%, Hallin et al. 2007). Eine andere Arbeitsgruppe fand diese Keime hauptsächlich in Wunden (37.5%), Sputum (36.6%) sowie intravenösen Kathetern (11%) unter 210 Probanden (Potel et al. 2007). Die Verteilung der fünf häufigsten *Spa*-Typen unter den diversen Entnahmearten war relativ homogen (vgl. Abb. 13). Zwar ist bekannt, dass sich bestimmte

Linien in ihrer Virulenz unterscheiden (Melles et al. 2004). Ein Hervortreten einzelner Stämme bei bestimmten Entnahmestellen beziehungsweise Infektionen, wie es etwa für den „Barnim Epidemiestamm“ oder eine Variante des Sequenztyps ST-239 bei Bakteriämien beobachtet wurde (RKI 2007b, Tab. 21, Edgeworth et al. 2007), konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies liegt möglicherweise an der zu niedrigen Stichprobengröße sowie der fehlenden Zuordnung von Isolationsquelle zu beobachteter Erkrankung.

Tab. 21: Die vier häufigsten epidemischen MRSA gegliedert nach ausgewählten Infektionen, basierend auf Einsendungen an das NRZ (RKI 2007b). ES = Epidemiestamm, BA = „Barnim MRSA“, BE = „Berliner MRSA“, RH = „Rhein-Hessen MRSA“, SD = „Süddeutscher MRSA“. Die vermehrte Häufigkeit des BA- und RH-Epidemiestammes bei bestimmten Infektionen spricht für eine höhere Virulenz dieser Linien.

Infektion	BA-ES (t032)	BE-ES (t004)	RH-ES (t003)	SD-ES (t001, t041)
Bakteriämie, Sepsis	47.8%	8.0%	40.7%	3.5%
Harnwegsinfektion	53.6%	6.4%	36.4%	3.6%
Pneumonie	53.5%	9.4%	28.2%	8.9%
Wundinfektion	47.7%	12.1%	32.9%	7.3%

7.2.4 Änderung der *Spa*-Typenverteilung in Jena im Jahresverlauf 2004

Deskriptiv ließen sich für die beiden Beobachtungszeiträume vor (bis 27.03.2004) und nach Umzug für die Kliniken der Chirurgie einschließlich Intensivmedizin sowie der Inneren Medizin zwar Unterschiede in der Verteilung der *Spa*-Typen feststellen, diese waren jedoch nicht signifikant ($p=0.096-1.000$). Gleiches gilt für den MRSA-Gesamtanteil auf den betrachteten Einrichtungen, welcher nichtsignifikanten Schwankungsbreiten von 0.3% (Chirurgie und Intensivmedizin, $p=1.000$) sowie 4.3% (Innere Medizin, $p=0.479$) vor beziehungsweise nach Umzug unterlag. Es ist daher nicht möglich, definitive Aussagen über die beobachtete Entwicklung zu machen. Zudem wurden bisher, soweit bekannt, noch keine vergleichbaren Untersuchungen durchgeführt, welche sich im Rahmen eines Klinikumzugs mit der Häufigkeitsverteilung bakterieller Subspezies beschäftigten. Vietri et al. (2004) analysierten über vier Jahre hinweg den möglichen Einfluss unterschiedlicher Stationsstrukturen vor beziehungsweise nach Umzug in ein neues Klinikgebäude auf die MRSA-Prävalenz. Trotz Umstellung auf moderne Infektionskontrollansätze (Einzel-, Doppel- und Vierbettzimmer anstatt 12-35 Patienten umfassende Liegesäle, 1 bis 2 Waschbecken pro Bett statt 1 bis 2 Waschmöglichkeiten pro Zimmer) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MRSA-Rate (4-7%) in den zwei Jahren vor oder nach Umzug festgestellt werden (Vietri et al. 2004). In einer anderen Studie fand sich ebenfalls kein nachweisbarer Effekt von Renovierungs- und gründlichen Dekontaminationsmaßnahmen auf die MRSA-

Kolonisationsrate einer chirurgischen Station vor beziehungsweise nach Durchführung der Baumaßnahmen (Barakate et al. 1999). Möglicherweise ist dies der MRSA-Rate von Neuzugängen (MRSA-Kolonisation in der Bevölkerung sowie von Patienten anderer Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen) zuzuschreiben, wodurch der Einfluss nosokomialer MRSA-Übertragungen geschmälert werden könnte. Insgesamt legt die tendenzielle Anpassung der *Spa*-Typenverteilung zwischen den Fachbereichen einen interdisziplinären Austausch von MRSA-Stämmen (kolonisierte/ infizierte Patienten, Personal) nach Umzug in den gemeinsamen Kliniksneubau nahe. Das Neuauftreten eines erst nach dem Umzug beobachteten *Spa*-Typs ist wohl auf die externe Einschleppung (auswärtige Klinik, Pflegeeinrichtung) zurückzuführen, obwohl dies auf Grund fehlender Datenlage der *Spa*-Verteilung vor 2004 allenfalls vermutet werden kann. Weitere und lückenlose Aufzeichnungen der *Spa*-Typen wären erforderlich, um derartige Thesen untermauern zu können.

7.2.5 Ausbruchsanalyse

Ausbrüche nosokomialer Infektionen sind ein Desaster für das betreffende Krankenhaus, da sie Stress für Patienten als auch Personal bedeuten und in verlängertem Aufenthalt, zusätzlichen medizinischen Maßnahmen, erhöhten Kosten sowie, in manchen Fällen, Tod resultieren (Gastmeier et al. 2005). Um derartige Ausbrüche zu identifizieren, werden in der Regel zeitaufwendige und ressourcenintensive Untersuchungen von Labordaten und Patientenakten durchgeführt (Mellmann et al. 2006). Die elektronische Analyse von Daten ist aussagetechnisch mit dieser klassischen epidemiologischen Herangehensweise vergleichbar (Mellmann et al. 2006) und kann helfen, mögliche Erkrankungs- und antimikrobielle Resistenzmuster zu erkennen (Peterson und Brossette 2002). Die Betrachtung der MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus in Eisenberg erfolgte retrospektiv an Hand der *Spa*-Typisierung von 34 Patienten- sowie vier Personalisolaten. Durch Vergleich zwischen erhöhter monatlicher Inzidenz (vgl. Abb. 17) und möglichen Übertragungswegen (mindestens zwei in Zusammenhang stehende Patienten) konnten ausschließlich für den *Spa*-Typ t041 Zeiträume mit Ausbruchsgeschehen (Juni bis Oktober 2004) definiert werden (vgl. 6.2.6). Insgesamt fanden sich vier klonale Cluster, an denen 2 bis 7 Patienten beteiligt waren, wobei das Geschehen im Monat März mit nur zwei betroffenen Probanden laut Definition (Tenover et al. 1995) keinen Ausbruch darstellt. Prinzipiell spricht die Tatsache, dass Patienten zwischen Juni und Oktober über einen längeren Zeitraum, eventuell auch mit Unterbrechung, betroffen waren, eher für eine Mensch zu Mensch-Übertragung (Ammon et al. 2001, Abb. 23 und Abb. 24). Diese erfolgt in den meisten Fällen durch die Hände des Pflegepersonals

(Kampf und Kramer 2004). Hierbei hat nicht nur die Anzahl von MRSA-Trägern auf einer Station direkten Einfluss auf die Häufigkeit solcher Kreuzinfektion (Nixon et al. 2006), sondern auch die erhöhte Arbeitsbelastung (Archibald et al., 1997) oder Unterbesetzung des Pflegepersonals (Grundmann et al. 2002).

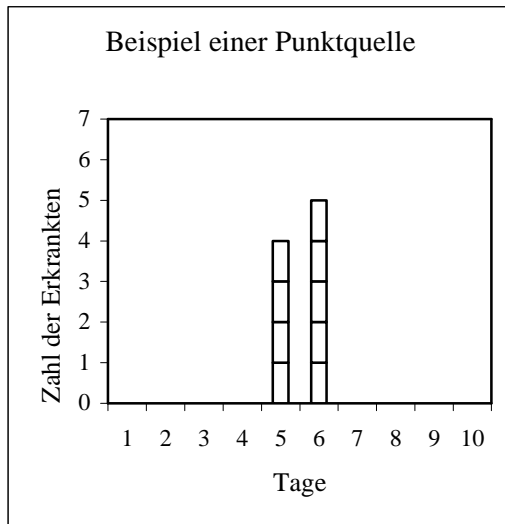


Abb. 23: Beispiel einer einmaligen Exposition gegenüber einer Punktquelle (nach Jarvis 1998).

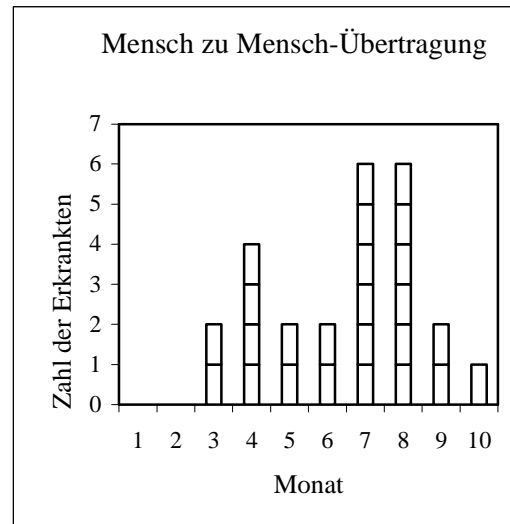


Abb. 24: Beispiel einer Mensch zu Mensch-Übertragung (nach Jarvis 1998).

Über mögliche Erregerquellen kann auf Grund unvollständiger Datenlage (Surveillancekulturen von Personal und Patientenumgebung) nur gemutmaßt werden, zumal der definitive Nachweis einer MRSA-Übertragung durch keine verfügbare Methode möglich ist (Mellmann et al. 2006). In einer Metaanalyse von 1022 Ausbrüchen nosokomialer Erreger (hierunter 116 MRSA-Ausbrüche) zeigte sich, dass in 37% der Fälle keine endgültige Aussage zur Erregerherkunft möglich war (Gastmeier et al. 2005). Insgesamt fanden sich als häufigste Infektionsquellen Patienten (25.7%), medizinische Instrumente (11.9%), die Patientenumgebung (11.6%) sowie Pflegepersonal (11%, Gastmeier et al. 2005). Die vier in dieser Studie MRSA-positiv getesteten Mitarbeiter (dreimal *Spa*-Typ t003, einmal t515) kommen auf Grundlage der *Spa*-Typisierung als mögliche Auslöser der beobachteten Ausbruchssituationen des Stamms t041 nicht in Frage. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass weitere Mitglieder des Pflegepersonals im Untersuchungszeitraum unerkannt MRSA-kolonisiert und somit mögliche Infektionsquellen waren. In einem Fall war ein Patient (PN 140), welcher bereits MRSA-positiv aufgenommen wurde (*Spa*-Typ t041), wahrscheinlich Auslöser des nachfolgenden Ausbruchsgeschehens (vgl. 10.1). Trotz konsequenter Isolationsmaßnahmen kam es hierbei möglicherweise zur Kreuzinfektion über die Hände des Personals sowie kontaminierte medizinische Instrumente oder Oberflächen auf zwei weitere Probanden derselben

beziehungsweise benachbarten Station. In den restlichen Fällen erscheint eine Übertragung der Erreger zwischen den Patienten auf genanntem Wege zwar ebenfalls plausibel, ein auslösender Faktor der Infektionskette war jedoch nicht nachweisbar. Einerseits ist erneut die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass es sich beim *Spa*-Typ t041 um einen endemischen Stamm handelt (Lang et al. 2007), welcher im Klinikum „zirkuliert“. Derartige Erreger sind besonders gut an die Bedingungen im Krankenhaus angepasst (Enright et al. 2002) und können monatelang auf unbelebten Objekten (Kramer et al. 2006) oder unerkannten Trägern (Pflegepersonal, asymptomatische Patienten) persistieren (RKI 2007a), bis sie in einem suszeptiblen Organismus eine Infektion auslösen (von Eiff et al. 2001). Da auch die Umgebung MRSA-infizierter oder -kolonisierter Patienten häufig mit genetisch verwandten Erregern kontaminiert ist, könnten diese Reservoirs einen wichtigen Beitrag zur Verbreitung endemischer MRSA liefern (Sexton et al. 2006). Andererseits ist bekannt, dass sich MRSA aus MSSA durch den Erwerb des *mecA*-Gens entwickeln (Robinson und Enright 2003, Layer et al. 2006). Da etwa 30% der Patienten am Rudolf-Elle-Krankenhaus kürzlich im Rahmen einer Studie als MSSA-Träger identifiziert wurden, von denen wiederum ein Drittel im Verlauf eine MSSA-Infektion entwickelte (Lang et al. 2007), ist nicht auszuschließen, dass es spontan oder unter dem erhöhten selektiven Druck (Antibiotikabehandlung bei Infektion) zu einem solchen *mecA*-Erwerb bei MSSA gleichen *Spa*-Typs kam. Letztlich sei noch anzumerken, dass auf Grund der Mutationsrate der X-Region des *Spa*-Gens in vivo (durchschnittlich 1 genetisches Ereignis in 70 Monaten, Kahl et al. 2005) auch ein anderer *Spa*-Typ als Auslöser (oder auch Begleitisolat) eines Ausbruchs in Frage kommt. Unter den gefundenen MRSA-Linien am Rudolf-Elle-Krankenhaus kommen auf Grund mit dem Ausbruchsstamm vergleichbarer Repeatsequenzen die *Spa*-Typen t001 (6 Isolate) sowie t820 (1 Isolat) in Betracht. Eine derartige Gruppierung ähnlicher *Spa*-Typen vereinfacht die Identifizierung epidemiologisch verwandter Stämme (Ruppitsch et al. 2006) und ist bereits Bestandteil moderner Typisierungssoftware (Mellmann et al. 2007). Dass Surveillancemethoden auf Basis der *Spa*-Typisierung und softwaregestützten, automatischen Frühwarnsystemen mit klassischen epidemiologischen Ansätzen vergleichbar sind, konnte bereits gezeigt werden (Mellmann et al. 2006). Ob derartige Verfahren auch am hiesigen Klinikum zu einer Überwachung der MRSA-Situation und Vermeidung von Ausbrüchen praktikabel einsetzbar sind, müsste durch weitere Studien untersucht werden.

7.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese gehört am mikrobiologischen Institut der Universität Jena zu einem langetablierten Verfahren, welches als „Goldstandard“ für die genotypische Differenzierung verschiedenster Bakterienspezies (Staphylokokken, Enterokokken etc.) eingesetzt wird. Erwartungsgemäß konnten daher sämtliche 38 im Jahr 2004 gesammelten Isolate problemlos analysiert werden. Berichte über auf Grundlage der PFGE nicht zu typisierende Staphylokokkenstämme sind, im Gegensatz zur *Spa*-Typisierung (0.1% Mellmann et al. 2007), nicht bekannt. Da die 34 untersuchten Patienten einen Ausschnitt der durch die *Spa*-Typisierung untersuchten Gesamtpopulation von 151 Probanden darstellen, wird bezüglich der Diskussion von Alters- und Geschlechtsverteilung auf den Abschnitt 7.1 verwiesen.

7.3.1 Manuelle Ermittlung der Pulsfeldtypen

Die Klassifizierung der Pulsfeldtypen erfolgte nach manueller Auswertung der Bandenunterschiede gemäß den bereits erläuterten Kriterien (Tenover et al. 1995, Abschnitt 5.3.5) und ergab 7 Pulsfeldtypen (A-G) sowie 4 Subtypen (A1-A4), welche sich in 4 bis 5 Banden vom Ausbruchsstamm A unterschieden. Da Bandenunterschiede in 4 bis 6 Positionen die epidemiologische Verwandtschaft zum Ausbruchsstamm bereits weniger wahrscheinlich machen (Tenover et al. 1995), werden in einigen Arbeiten lediglich Pulsfeldmuster mit 2 bis 3 Bandendifferenzen als Subtypen des Referenzstamms klassifiziert (Strommenger et al. 2006, Cookson et al. 2007). Insgesamt gestaltete sich die manuelle Zuordnung der Pulsfeldtypen durch Auszählen der Bandendifferenzen als äußerst mühsam, zeitaufwendig und subjektiv verzerrt, da verschiedene Untersucher zu abweichenden Ergebnissen kamen. Zwar gibt es seit Langem Bemühungen, Arbeitsprotokolle und Interpretationskriterien zu vereinheitlichen, um nationale oder länderübergreifende Pulsfelddatenbanken zu etablieren (Mc Dougal et al. 2003, Murchan et al. 2003). Dennoch belegen zahlreiche Studien die begrenzte intra- und interlaborative Reproduzierbarkeit der PFGE (van Belkum et al. 1998b, Mulvey et al. 2001, Murchan et al. 2003). Zudem wird die Auswertung der Pulsfelder mit zunehmender Probenanzahl schwieriger und anspruchsvoller, weshalb eine Anwendung über längere Zeiträume oder bei großen Patientengruppen nicht empfohlen wird (Tenover et al. 1995, van Belkum et al. 1998b).

7.3.2 Digitale Auswertung der Pulsfeldtypen

Die grafisch-digitale Umsetzung der Verwandtschaft aller Pulsfeldtypen in Form eines Dendrogramms erfolgte mit Hilfe der Software Image Master 1D. Dies gestaltete sich

insofern schwierig, da die drei eingescannten Pulsfeldgele erst zu einer Datei zusammengefasst werden mussten, um alle Stämme analysieren zu können. Zudem wurden entsprechende Banden der Pulsfeldmuster nicht in allen Fällen automatisch erkannt, weshalb häufig manuelle Nachkorrekturen notwendig waren. Letztlich lag die Übereinstimmung der zuvor gruppierten Pulsfeldtypen auf Grundlage des Dice-Koeffizienten zwischen $\geq 22\%$ bei nichtverwandten Stämmen, $\geq 82\%$ bei Subtypen des Referenzstammes und 100% beim Pulsfeldtyp A. Diese Werte sind mit denen anderer Arbeiten (30-65-100% Pantůček et al. 1996, 31-80-100% Hennekinne et al. 2003) vergleichbar, wobei Übereinstimmungen der Pulsfeldmuster zwischen 30-100% als charakteristisch für die Spezies *Staphylococcus aureus* angesehen werden (Pantůček et al. 1996). Die Verwendung eines „cutoff value“ von $\geq 80\%$ für verwandte Isolate, wie er in mehreren Arbeiten vorgeschlagen wird (Mc Dougal et al. 2003, Murchan et al. 2003, Carriço et al. 2005), scheint daher für künftige MRSA-Untersuchungen erstrebenswert, damit auf die manuelle und zeitintensive Auszählung der Bandendifferenzen verzichtet werden kann. Interessanterweise deckt die begrenzte Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Isolate das Spektrum der genetischen Vielfalt dieser Erregerart weitestgehend ab. Eine Einordnung der Stämme in überregionale Ausbreitungswege, wie es für einige pulsfeldstabile MRSA-Linien bereits erfolgte (Chung et al. 2000, Simor et al. 2002), ist auf Grund fehlender Pulsfelddatenbanken und interlaborativer Vergleichbarkeit derzeit jedoch noch nicht möglich. Sowohl in Europa als auch in den USA ist man daher um den Aufbau einer nationalen Datenbank bemüht (Mc Dougal et al. 2003, Murchan et al. 2003), wie sie in den Vereinigten Staaten beispielsweise für das Bakterium *Escherichia coli* schon existiert (Swaminathan et al. 2001). Durch neuerliche Fortschritte im Bereich der Gelanalyse-Software scheint die Überwindung traditioneller Barrieren beim Austausch von Pulsfeldmustern greifbar nah, selbst wenn die Daten unter verschiedenen Elektrophoreseparametern ermittelt wurden (Swaminathan et al. 2001).

7.4 Vergleich von *Spa*-Typisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese

7.4.1 Typisierungsergebnisse im Rahmen des Ausbruchsgeschehens

Vor eingehender Betrachtung diskutabler Typisierungsergebnisse von PFGE und *Spa*-Sequenzanalyse wurden die relevanten Stämme nochmals gegenübergestellt (Abb. 25).












	Pulsfeldtyp	<i>Spa</i> -Typ		Pulsfeldtyp	<i>Spa</i> -Typ
PFN 28		A t041	PFN 39		C t003
PFN 27		A t001	PFN 24		C t003
PFN 10		A2 t001	PFN 23		C t003
PFN 07		A3 t820	PFN 22		C t003
PFN 01		A3 t001	PFN 19		G t515
			PFN 18		G t515

Abb. 25: Gegenüberstellung von ermitteltem Pulsfeldtyp (einschließlich Bandenmuster) und *Spa*-Typ ausgewählter Isolate. Die Pulsfeldnummer (PFN) 28 wurde als Repräsentant des Ausbruchsstammes A vergleichend ergänzt. Grau unterlegt: Mitarbeiterisolate.

Die PFGE ergab 11 verschiedene Pulsfeldmuster, wohingegen die *Spa*-Typisierung bei den vorliegenden Isolaten 6 Gruppen differenzieren konnte. Nach Unterteilung der Pulsfelder in 7 Haupt- und 4 Subtypen ergab sich in 33 (86.8%) von 38 Fällen eine Übereinstimmung beider Verfahren. Für die Analyse möglicher Übertragungswege sowie Ausbruchssituationen zeigen die Ergebnisse der PFGE im Vergleich zur *Spa*-Typisierung folgendes Bild: Ein Stamm (PFN 27, *Spa*-Typ t001, Pulsfeldtyp A) war sicher Teil des Ausbruchsgeschehens (*Spa*-Typ t041). Drei weitere Stämme (PFN 1, 7 und 10, *Spa*-Typ t001 und t820, Pulsfeldtyp A2 und A3, BD 4-5) waren als Subtypen möglicherweise ebenfalls hieran beteiligt (Abb. 25). Allerdings sei erwähnt, dass ab einer Bandendifferenz >3 bereits Unterschiede in anderen Typisierungsverfahren recht wahrscheinlich sind (Tenover et al. 1995), und eine korrekte Zuordnung zum Ausbruchsstamm nicht mehr möglich ist (Singh et al. 2006). Ob diese drei Isolate letztlich Teil des Ausbruchsgeschehens waren, kann somit auf Grundlage der beiden Typisierungsverfahren nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin bestand wegen der identischen Pulsfeldmuster zwischen Mitarbeiter- und zwei Patientenisolaten (PFN 19 und 39, vgl. Abb. 25) tatsächlich ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen diesen Stämmen, welcher im Rahmen der Analyse möglicher Übertragungswege trotz gleicher *Spa*-Typen auf Grund der großen zeitlichen Trennung von 63 beziehungsweise 122 Tagen vernachlässigt wurde. Da der „Patientenstamm“ t515 (Eingang 18.07.2004, PN 61, PFN 19) vor dem

„Mitarbeiterstamm“ t515 gleichen Pulsfeldmusters (Eingang 17.11.2004, M4, PFN 18) isoliert wurde, ist anzunehmen, dass sich besagter Mitarbeiter bei diesem Patienten ansteckte (Abb. 25). Natürlich ist nicht auszuschließen, dass die MRSA-Kolonisation der Pflegekraft schon länger bestand, und somit Auslöser für die Infektion des Patienten war. Letzteres gilt offenbar für die restlichen Personalisolate des *Spa*-Typs t003 (Eingang 23.08.2004, M1-M3, PFN 22-24). Ein Patientenisolat mit identischem Pulsfeld (Eingang 25.10.2004, PN 83, PFN 39, Abb. 25) konnte etwa zwei Monate später gewonnen werden, weshalb von einer missglückten Eradikation oder Rekolonisation mindestens eines Mitarbeiters auszugehen ist, die sehr wahrscheinlich zur Infektion des Patienten führte. Insofern hätte die PFGE gegenüber der *Spa*-Typisierung für die Betrachtung der MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus bei 3 der 5 besprochenen Patienten isolate (PFN 19, 27 und 39) die definitive Einordnung in das Infektionsgeschehen ermöglicht. Gleichsam bleibt festzuhalten, dass insbesondere bei wiederholtem Auftreten vergleichsweise seltener *Spa*-Typen (t001 mit 15.8% und t515 mit 5.2% unter allen Isolaten) selbst über längere Zeiträume hinweg an eine Übertragung durch unerkannte Träger gedacht werden sollte.

Betrachtet man die *Spa*-Typen der fünf Isolate genauer, bei denen sich keine Übereinstimmung mit der PFGE ergab, so zeigt sich eine gewisse Ähnlichkeit in Bezug auf die *Spa*-Repeatabfolge (vgl. Abb. 26).







		Pulsfeldtyp	<i>Spa</i> -Typ	Repeatabfolge
PFN 28		A	t041	26-30- -17-34-17-20-17-34-17-20-17-12-17-16
PFN 27		A	t001	26-30- -17-34-17-20- -17-12-17-16
PFN 10		A2	t001	26-30- -17-34-17-20- -17-12-17-16
PFN 07		A3	t820	26-30-30-17-34-17-20- -17-12-17-16
PFN 01		A3	t001	26-30- -17-34-17-20- -17-12-17-16
PFN 02		D	t001	26-30- -17-34-17-20- -17-12-17-16

Abb. 26: Synopsis von ermitteltem Pulsfeldtyp (einschließlich Bandenmuster) und *Spa*-Typ (einschließlich Repeatabfolge) bei Isolaten mit abweichenden Typisierungsergebnissen in beiden Verfahren. Die Pulsfeldnummer (PFN) 28 wurde als Repräsentant des Ausbruchsstammes A vergleichend ergänzt. Grau unterlegt: Unterschiede in der Repeatabfolge der dargestellten *Spa*-Typen.

Der Typ t820 (PFN 7) unterscheidet sich lediglich durch die Duplikation eines einzelnen Repeats vom Typ t001. Da die Pulsfeldnummern 1 (*Spa*-Typ t001, Isolation 02.01.04) und 7 (*Spa*-Typ t820, Isolation 01.03.04) identisch sind (vgl. Abb. 26), ist hier wahrscheinlich von einer genetischen Evolution auszugehen, welche erst kürzlich und möglicherweise im Rahmen des Ausbruchs stattgefunden hat. Der Typ t001 (PFN 1, 2, 10 und 27) unterscheidet

sich durch die Deletion von vier aufeinander folgenden Repeats vom Ausbruchsstamm t041. Auf Grund identischer Pulsfelder der PFN 27 (*Spa*-Typ t001, Isolation 22.11.04) und des Ausbruchstamms A (*Spa*-Typ t041, erstmalige Isolation 06.02.04), hat die Deletion der vier zusammenhängenden *Spa*-Repeats in diesem einen Fall wohl ebenfalls im Rahmen des Ausbruchsgeschehens stattgefunden. Natürlich ist trotz der größeren Häufigkeit des Ausbruchstamms t041 zu erwähnen, dass derartige Veränderung der Repeatsequenzen hierbei auch umgekehrt denkbar sind, also vom *Spa*-Typ t001 oder t820 zum *Spa*-Typ t041 hin. Bei zwei weiteren Stämmen (PFN 1, Isolation 02.01.04 sowie PFN 10, Isolation 25.04.2004) stellen die Pulsfeldtypen Subtypen des Ausbruchstamms dar, weshalb auch hier ein solches genetisches Ereignis nicht gänzlich auszuschließen ist. Im letzten Fall (PFN 2, Isolation 14.01.04) ist der Pulsfeldtyp jedoch von dem des Ausbruchstamms verschieden, was die Verwandtschaft oder Klonalität auf Basis erst kürzlich stattgefundener Deletion der Repeatsequenz unwahrscheinlich macht. Diese unzureichende Diskriminierung nichtverwandter Stämme offenbart gleichzeitig eine Schwäche der *Spa*-Typisierung im Vergleich zur PFGE. Veränderungen der X-Region des *Spa*-Gens werden bekanntermaßen häufiger durch Änderung der Repeatanzahl (Duplikation, Deletion) als durch Punktmutationen hervorgerufen (Koreen et al. 2004, Kahl et al. 2004). In den meisten Fällen finden derartige Neuarrangements der *Spa*-Repeats im Rahmen der DNA-Replikation (Doppelstrangbruchreparatur, „Slipped Strand Mispairing“) statt (van Belkum et al. 1998a, Bzymek und Lovett 2001), ohne dass sich größere Änderungen in der Sekundärstruktur resultierender Peptidketten ergeben (Koreen et al. 2004). Ein Wechsel des *Spa*-Typs resultiert zudem nicht zwangsläufig in einem anderen Pulsfeldmuster, was im Umfang dieser und anderer Arbeiten gezeigt werden konnte (Lang et al. 2005b, Hilmar et al. 2005). Um im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen dennoch schlüssige Aussagen über die Verwandtschaft verschiedener Stämme machen zu können, und der großen Anzahl verschiedener *Spa*-Typen Herr zu werden, ist eine weitere Klassifikation in so genannte „klonale *Spa*-Komplexe“ (*Spa*-CC) sinnvoll, welche Ähnlichkeiten in der Repeatsequenz berücksichtigt (Robinson und Enright 2003). Dies kann entweder durch visuelle Analyse der Repeatabfolge (Ruppitsch et al. 2006) oder computergestützt erfolgen (ab ©Ridom Staph Type Version 1.5, Mellmann et al. 2007). Die alleinige Klassifizierung auf Basis einer molekularen Untersuchung ist jedoch nicht in der Lage zu klären, ob bestimmte Subtypen auseinander hervorgegangen sind oder getrennte Einschleppungen von außen repräsentieren (Ruppitsch et al. 2006), weshalb im Zweifelsfall auf epidemiologische Daten und andere Typisierungsverfahren, wie etwa die PFGE, zurückgegriffen werden sollte.

7.4.2 Diskriminationsvermögen, Praktikabilität und Kosten

Die Kriterien für die Eignung eines Typisierungsverfahrens umfassen Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit, Diskriminationsvermögen, Anwender- und Interpretationsfreundlichkeit sowie nicht zuletzt den Kostenaufwand (Olive und Bean 1999). Bezüglich der Typisierbarkeit wurden in dieser Arbeit zwischen PFGE und *Spa*-Typisierung (jeweils 100%) keine Unterschiede festgestellt, wenngleich Berichte über nicht *Spa*-typisierbare Stämme existieren (0.1% Mellmann et al. 2007). Die Reproduzierbarkeit, welche im Rahmen dieser Studie nicht näher überprüft wurde, unterscheidet sich hingegen für beide Verfahren. Wird die *Spa*-Typisierung im Allgemeinen als hochreproduzierbar angesehen (Aires de Sousa et al. 2006), so ist dies bei der PFGE sowohl inter- als auch intralaborativ nur begrenzt der Fall (Mulvey et al. 2001, Murchan et al. 2003). Um das Diskriminationsvermögen eines Typisierungsverfahrens an Hand des Diversitätsindex' angemessen bewerten zu können, sollte die Testpopulation ausreichend groß ($N > 100$) und repräsentativ sein und die untersuchten Stämme möglichst keine Verwandtschaft aufweisen (Struelens 1996). Obwohl keine dieser Bedingungen beim Vergleich von PFGE (Diversitätsindex = 71.3%) und *Spa*-Typisierung (DI = 60.9%) auf Grundlage des untersuchten Kollektivs ($N=38$) mit Ausbruchsgeschehen (verwandte Isolate) erfüllt wurde, lässt sich zumindest ein Trend im Auflösungsvermögen beider Verfahren erkennen, welcher weithin akzeptiert wird. Demnach verfügt die PFGE im Allgemeinen über ein etwas besseres Diskriminationsvermögen (DI 96.1-99.7%) als die *Spa*-Typisierung (DI 91.3%-97.3%, Cookson et al. 2007, Faria et al. 2007, Hallin et al. 2007). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass der in dieser Arbeit ermittelte Unterschied der DI's statistisch nicht signifikant ist (vgl. 6.4.1). Selbst wenn alle *Spa*-typisierten Proben in die Berechnung miteinbezogen werden, so ergibt sich nur ein DI von 83.2%, was letztlich der regional begrenzten und nicht-repräsentativen Testpopulation einschließlich des hohen klonalen Erregeranteils in Eisenberg zuzuschreiben ist. Wenngleich die PFGE im Rahmen der nosokomialen Ausbruchsanalyse somit nach wie vor außerordentlich wertvoll ist (Aucken et al. 2002, Cookson et al. 2007), hat sich bezüglich der epidemiologischen Aussagekraft längerfristiger Studien gezeigt, dass die *Spa*-Typisierung in Verbindung mit dem BURP-Algorithmus Ergebnisse liefert, welche mit denen bisherig verwendeter Standardmethoden (MLST) vergleichbar sind (Faria et al. 2007, Mellmann et al. 2007, Abb. 27). Jüngste Ergebnisse legen nahe, dass auch die PFGE für derartige Langzeitstudien geeignet ist (Deplano et al. 2006, Abb. 27), wenngleich die Komplexität des Verfahrens mit steigender Probenanzahl dramatisch zunimmt (Faria et al. 2007).

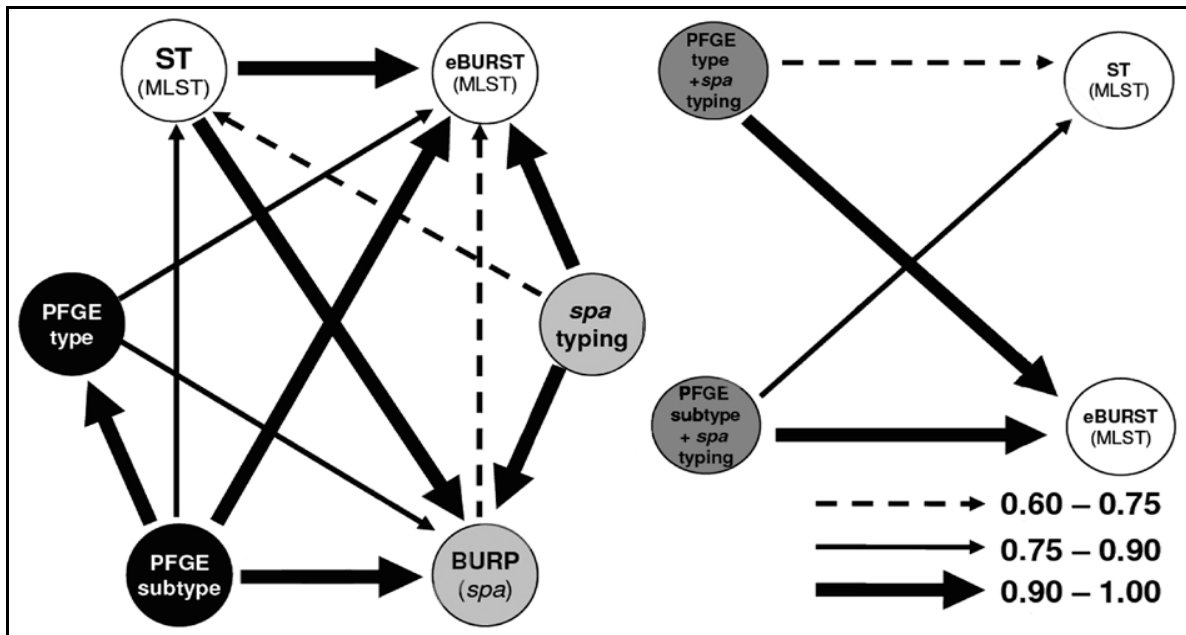


Abb. 27: Schematische Darstellung der Übereinstimmungen verschiedener Typisierungsverfahren sowie Kombinationen von Typisierungsverfahren, welche auf Grundlage des Wallace-Koeffizienten (WK) nach Auswertung einer internationalen Stammkollektion (116 MRSA und 82 MSSA) berechnet wurden (Faria et al. 2007). Hohe WK's sind ein positives Vorhersagemass für die Ergebnisse einer Typisierungsmethode auf Grundlage eines anderen Verfahrens. Die Pfeildicke repräsentiert den Wert des WK, welcher für beide Pfeilrichtungen identisch ist. ST = Sequenztyp auf Basis der MLST, PFGE subtype = cutoff-Wert von 95% für gleiche Typen, PFGE type = cutoff-Wert von 80% für gleiche Typen, „spa typing“ = *Spa*-Typisierung, BURP = Algorithmus zur Gruppierung verwandter Genotypen auf Basis der *Spa*-Typisierung, eBURST = Algorithmus zur Gruppierung verwandter Genotypen auf Basis der MLST.

Bezüglich Anwender- und Interpretationsfreundlichkeit ist die *Spa*-Typisierung auf Grund der Übertragbarkeit elektronisch gespeicherter Daten sowie eindeutiger Ergebnisse (Zuordnung eines diskreten *Spa*-Typs, Lang et al. 2005a) der PFGE deutlich überlegen (Strommenger et al. 2006), zumal ein problemloser Abgleich mit einer ständig aktualisierten, zentralen Internetdatenbank möglich ist (<http://www.spaserver.ridom.de>). Ein Grundstein für ein internationales MRSA-Typisierungsnetzwerk ist inzwischen mit der SeqNet.org-Initiative (<http://www.seqnet.org>) gelegt worden, an der sich Laboratorien aus 19 europäischen Ländern beteiligen, welche sich auf die *Spa*-Typisierung als einheitlichen Typisierungsstandard geeinigt haben (Mellmann et al. 2005). Trotz intensiver Bemühungen um den Aufbau nationaler Pulsfelddatenbanken (Mc Dougal et al. 2003, Murchan et al. 2003) scheint ein vergleichbares Projekt derzeit noch nicht greifbar. Gerade durch das zunehmende Auftreten von cMRSA wird das Verständnis der Populationsstruktur dieser Erreger immer wichtiger, um die Verbreitungswege inner- als auch außerhalb von Krankenhäusern besser verstehen zu können (Okuma et al. 2002). Hierzu sind jedoch vergleichbare und zentral erfasste Datensätze notwendig, wie sie derzeit nur durch die *Spa*-Typisierung geliefert werden können.

In Punkto Zeit- und Kostenaufwand war die *Spa*-Typisierung im Rahmen dieser Arbeit der PFGE nicht nur ebenbürtig, sondern sogar leicht überlegen. Waren für die Bearbeitung einer PFGE-Probe etwa 1.5h bei einer Aufwendung von 39€ nötig, so betrugen diese Werte bei der *Spa*-Typisierung nur rund 1h je Probe bei Kosten von etwa 35€. Die Ergebnisse der *Spa*-Typisierung lagen nach 3 Tagen vor, wohingegen die Ermittlung der Pulsfeldtypen etwa 5 Tage in Anspruch nahm. Zwar kann die PFGE auch innerhalb von nur 3 Tagen zu einem vergleichbaren Ergebnis führen (Matushek et al. 1996). Dennoch sind ähnliche Trends bezüglich Ausgaben und Verfügbarkeit der Ergebnisse in mehreren Studien beobachtet wurden (Montesinos et al. 2002, Saiman et al. 2003, Mellmann et al. 2006). Zudem sind im besten Falle bereits nach 2 Tagen Ausschlussdiagnosen für die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Stamm auf Grundlage der *Spa*-PCR und des „*Spa*-Ladders“ möglich, welcher die Länge der X-Region unterschiedlicher Erreger auf ± 1 Repeat genau differenzieren kann. Die vergleichsweise hohen Ausgaben für beide Typisierungsmethoden relativieren sich, wenn man bedenkt, dass durch solche Verfahren in Verbindung mit epidemiologischer Surveillance Kosteneinsparungen auf Grund einer Dezimierung nosokomialer Infektionen möglich sind (Peterson und Brossette 2002, Diekema et al. 2004). Da definitive Ergebnisse der *Spa*-Typisierung etwa zwei Tage vor Auswertung der Pulsfelddaten vorliegen, ist hier von einer beträchtlichen Ressourceneinsparung durch frühzeitige Aufdeckung etwaiger MRSA-Ausbrüche oder -Infektionsketten bei Nachweis einer klonalen Erregernatur auszugehen. Die zeitnahe Erkennung eines Ausbruchs und die Abgrenzung von Pseudoausbrüchen durch zeitgleiche Aufnahmen sind letztlich entscheidend, um unnötige Hygienemaßnahmen für Patienten und Personal zu vermeiden (Mellmann et al. 2005). Zudem können hierdurch teure epidemiologische Untersuchungen entfallen (Singh et al. 2006). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass die Amortisationskosten der Analysegeräte beider Verfahren in der hier angewandten Rechnung nicht berücksichtigt wurden, weshalb die Ausgaben für die *Spa*-Typisierung letztlich doch höher sein dürften als die der PFGE. Zudem wäre der Einsatz des hauseigenen Einkapillarsequenzers anstatt des verwendeten 48-Kapillarsequenzers für die Routinetypisierung diskutabel. Da durchschnittlich etwa 1 MRSA-Stamm pro Arbeitstag isoliert wurde (5-Tage-Arbeitswoche), wäre hiermit eine kostengünstigere und dennoch zeitnahe Analyse eingegangener Erreger möglich. Ergänzend sei noch hinzugefügt, dass die PFGE am Institut für Mikrobiologie eine bewährte und etablierte Methode darstellt. Zur Durchführung der *Spa*-Typisierung wären folglich die zusätzliche Einarbeitung mindestens zweier Fachkräfte sowie die Überbrückung einer gewissen „Anlaufspanne“ notwendig, was im Rahmen einer möglichen Einführung des Verfahrens beachtet werden müsste.

Letztlich ist nach vergleichender Betrachtung beider Verfahren festzuhalten, dass die *Spa*-Typisierung zwar Vorteile gegenüber der Pulsfeld-Gelelektrophorese bezüglich Verfügbarkeit der Ergebnisse, Interpretations- und Anwenderfreundlichkeit, Datenverwaltung und selbst des Kostenfaktors besitzt. Dennoch erweist sie sich auf Grund des etwas geringeren Diskriminationsvermögens gerade bei der Ausbruchsanalyse nicht in jedem Fall als die der PFGE überlegene Technik. Zwar haben viele Studien gezeigt, dass der Einsatz zweier Verfahren die epidemiologische Beurteilung nicht signifikant verbessert (Singh et al. 2006), was insgesamt auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde. Dennoch scheint die zusätzliche Anwendung der PFGE im Einzelfall sinnvoll, um die richtigen Schlussfolgerungen aus den ermittelten Ergebnissen ziehen zu können (Lang et al. 2005b).

8 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit erfolgte Gegenüberstellung von *Spa*-Typisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

Beide Verfahren ermöglichten eine vollständige Klassifizierung der im Jahr 2004 zu untersuchenden MRSA-Isolate und verfügen somit gleichermaßen über ein hohes Maß an Typisierbarkeit der Erreger.

Die *Spa*-Sequenzanalyse lieferte hierbei in Bezug auf *Spa*-Typenverteilung und -stabilität sowie die MRSA-Rate verschiedener Fachabteilungen des Universitätsklinikums Jena Ergebnisse, welche auf Grund ihrer eindeutigen Zuordnung und elektronischen Portabilität erstmals einen bundesweiten Vergleich zuließen. Hieraus ergeben sich neue Möglichkeiten für weitere, vergleichende Studien der MRSA-Epidemiologie.

Der mögliche Einsatz zur Surveillance von Ausbruchsgeschehen erbrachte an Hand retrospektiver Auswertung der MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus ein vermindertes Diskriminationsvermögen der *Spa*-Typisierung (DI = 60.9%) gegenüber der PFGE (DI = 71.3%), obschon sich kein signifikanter Unterschied zeigte. Im Einzelfall bleibt die Anwendung der Pulsfeld-Gelelektrophorese somit wohl unverzichtbar, um die richtigen Schlussfolgerungen aus den ermittelten Ergebnissen ziehen zu können.

Die Kostenanalyse beider Verfahren zeigte insgesamt nur geringfügige Unterschiede zu Gunsten der *Spa*-Typisierung.

Durch die schnellere Verfügbarkeit der Sequenzierungsergebnisse, welche zu einer Zeiterparnis von bis zu 48h führt, sowie durch Neuerungen in der Analysesoftware, welche die Zuordnung epidemiologisch verwandter Stämme erleichtert, ergeben sich für die *Spa*-Typisierung deutliche Einsparungspotentiale durch frühzeitige Aufdeckung etwaiger MRSA-Ausbrüche oder -Infektionsketten bei Nachweis einer klonalen Erregernatur.

Am Rudolf-Elle-Krankenhaus konnte eine Häufung und molekulare Evolution des *Spa*-Typs t041 nachgewiesen werden, welcher wahrscheinlich einen endemischen Hospitalkeim darstellt, und für den vergleichsweise hohen MRSA-Anteil von 27.6% (Bundesdurchschnitt 22.6%, Klinikum Jena 7.9%) des Jahres 2004 verantwortlich war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Einführung der *Spa*-Typisierung am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena gerade zur dauerhaften Überwachung der MRSA-Situation sinnvoll erscheint.

Die Tatsache, dass im Rahmen der Ausbruchsanalyse bei bis zu 38% der betroffenen Patienten eine Kreuzinfektion möglich erscheint, unterstreicht die wichtige Bedeutung strikter Compliance von Hygienemaßnahmen sowie die regelmäßige Kontrolle des Trägerstatus unter Mitarbeitern, um die Gefahr von Keimübertragungen und Ausbrüchen zu minimieren.

Zudem bestätigt sich die Notwendigkeit eines MRSA-Screenings von aufzunehmenden Patienten, um auch das Risiko unerkannter Erregereinschleppung in die Klinik durch frühzeitige Isolierung betroffener Personen zu minimieren, was zumindest für Risikopatienten seit Ende des Jahres 2004 am Universitätsklinikum Jena umgesetzt wurde.

9 Literaturverzeichnis

Aires de Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FC, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W. 2006. High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *J Clin Microbiol*, 44(2):619-621.

Aires de Sousa M, de Lencastre H. 2004. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40(2):101-111.

Ammon A, Gastmeier P, Weist K, Kramer MH, Petersen LR. 2001. Empfehlungen zur Untersuchung von Ausbrüchen nosokomialer Infektionen. RKI-Heft 21. Herausgeber: Robert Koch-Institut. www.rki.de (Zugriff 12.12.2007).

Archer GL. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis*, 26(5):1179-1181.

Archibald LK, Manning ML, Bell LM, Banerjee S, Jarvis WR. 1997. Patient density, nurse-to-patient ratio and nosocomial infection risk in a pediatric cardiac intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*, 16(11):1045-1048.

Aucken HM, Ganner M, Murchan S, Cookson BD, Johnson AP. 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 50(2):171-175.

Bannerman TL, Peacock SJ. 2007. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive Cocci. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Hrsg. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Vol 1: American Society of Microbiology, 390-411.

Barakate MS, Harris JP, West RH, Vickery AM, Sharp CA, Macleod C, Benn RA. 1999. A prospective survey of current methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control measures. *Aust N Z J Surg*, 69(10):712-716.

- Barr B, Wilcox MH, Brady A, Parnell P, Darby B, Tompkins D. 2007. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among older residents of care homes in the United Kingdom. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28(7):853-9.
- Bergmans D, Bonten M, Gaillard C, de Leeuw P, van Tiel F, Stobberingh E, van der Geest S. 1996. Clinical spectrum of ventilator-associated pneumonia caused by methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(6):437-45.
- Blanc DS, Francioli P, Hauser PM. 2002. Poor value of pulsed-field gel electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 2(2):145-148.
- BOP (Bureau of Prisons). 2005. Clinical practice guidelines for the management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections.
<http://www.bop.gov/news/PDFs/mrsa.pdf> (Zugriff 12.12.2007).
- Boyce J M, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T. 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18(9):622-627.
- Boyce JM. 1989. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: detection, epidemiology, and control measures. *Infect Dis Clin North Am*, 3(4):901-913.
- Bures S, Fishbain JT, Uyehara CF, Parker JM, Berg BW. 2000. Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit. *Am J Infect Control*, 28(6):465-471.
- Bzymek M, Lovett ST. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(15):8319-25.
- Cai Y, Kong F, Wang Q, Tong Z, Sintchenko V, Zeng X, Gilbert GL. 2007. Comparison of Single- and Multilocus Sequence Typing and Toxin Gene Profiling for Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 45(10):3302-3308.

- Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão G, de Lencastre H, Almeida JS. 2005. Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 43(11):5483-5490.
- Castro N, Loaiza-Loeza MS, Calderón-Navarro A, Sánchez A, Silva-Sánchez J. 2006. Molecular study of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in a Mexican hospital. *Rev Invest Clin*, 58(6):580-5.
- Catalogue of Life. 2007. <http://www.catalogueoflife.org> (Zugriff 12.12.2007).
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2005. Community-associated MRSA information for clinicians. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html. (Zugriff 12.12.2007).
- Cesur S, Çokça F. 2004. Nasal Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Hospital Staff and Outpatients *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25(2):169-171.
- Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, and the Multilaboratory Project Collaborators: Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sa-Leão R, Sanches IS, Song J, Tassios PT, Villari P. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*, 6(3):189–198.
- Chung M, Dickinson G, de Lencastre H, Tomasz A. 2004. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol*, 42(2):542-547.
- Clements MO, Foster SJ. 1999. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 7(11):458-62.

Conceição T, Aires-de-Sousa M, Füzi M, Tóth Á, Pászti J, Ungvári E, van Leeuwen WB, van Belkum A, Grundmann H, de Lencastre H. 2007. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. Clin Microbiol Infect, 13(10):971-9.

Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Müller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O'Connell B, Short BD, Thomas J, O'Hanlon S, Enright MC. 2007. Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: the HARMONY Collection. J Clin Microbiol, 45(6):1830-1837.

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis, 36(1):53-9.

Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. 2004. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. Clin Infect Dis, 39(6):776-82.

de Allori MC, Jure MA, Romero C, de Castillo ME. 2006. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. Biol Pharm Bull, 29(8):1592-6.

Deplano A, De Mendonca R, De Ryck R, Struelens MJ. 2006. External quality assessment of molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates by a network of laboratories. J. Clin. Microbiol, 44(9):3236-3244.

Deplano A, Witte W, van Leeuwen WJ, Brun Y, Struelens MJ. 2000. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. Clin Microbiol Infect, 6(5):239-245.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 13(3):222-35.

Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, Pfaller MA. 2004. Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. *J Clin Microbiol*, 42(7):2879-2883.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13(1):16-34.

Edgeworth JD, Yadegarfar G, Pathak S, Batra R, Cockfield JD, Wyncoll D, Beale R, Lindsay JA. 2007. An Outbreak in an Intensive Care Unit of a Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 239 Associated with an Increased Rate of Vascular Access Device–Related Bacteremia. *Clin Infect Dis*, 44(4):493-501.

Emori TG, Gaynes RP. 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6(4): 428-442.

Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, Briggs JP, Sexton DJ, Kaye KS. 2003. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis*. 36(5):592-8.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(11):7687-92.

Enright MC, Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7(12):482-7.

Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. 2007. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and susceptible 2 *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* [Epub ahead of print].

Foster TJ. 2004. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *J Clin Invest*, 114(12):1693-1696.

Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3(12):948-958.

Frees D, Sørensen K, Ingmer H. 2005. Global Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*: Pinpointing the Roles of ClpP and ClpX in the *sar/agr* Regulatory Network. *Infect Immun*, 73(12):8100-8108.

Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(1):60-4.

Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR. 1994. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol*, 32(3):846-7.

Gandelman G, Frishman WH, Wiese C, Green-Gastwirth V, Hong S, Aronow WS, Horowitz HW. 2007. Intravascular device infections: epidemiology, diagnosis, and management. *Cardiol Rev*, 15(1):13-23.

Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nitzschke-Tiemann F, Zuschneid I, Groneberg K, Rüden H. 2005. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1.022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 26(4):357-361.

Geipel U, Herrmann M. 2004. The infected implant. Part 1: bacteriology. *Orthopäde*, 33(12):1411-26; 1427-8.

GENARS (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance). 2007.
<http://www.genars.de/> (Zugriff 12.12.2007).

Georgopapadakou NH, Liu FY. 1980. Binding of β -lactam antibiotics to penicillinbinding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 18(5):834-6.

Ghuysen JM. 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*, 2(10):372-380.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 359(9308):753-9.

- Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H. 2005. Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(1):366-379.
- Gould IM. 2006. Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28(5):379-384.
- Grundmann H, Hori S, Tanner G. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol*, 39(11):4190-4192.
- Grundmann H, Hori S, Winter B, Tami A, Austin DJ. 2002. Risk factors for the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an adult intensive care unit: fitting a model to the data. *J Infect Dis*, 185(4):481-8.
- Guss B, Uhlén M, Nilsson B, Lindberg M, Sjöquist J, Sjödahl J. 1984. Region X, the cell-wall-attachement part of staphylococcal protein A. *Eur J of Biochemistry*, 138(2):413-420.
- Hahn H, Miksits K, Gatermann S. 2005. Staphylokokken. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Fünfte Aufl. Heidelberg: Springer Verlag, 187-198.
- Hallin M, Denis O, Deplano A, de Mendonc R, de Ryck R, Rottiers S, Struelens MJ. 2007. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. *J Antimicrob Chemother*, 59(3):465-472.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Voge U. 2003. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. *J of Clin Microbiology*, 41(12):5442-5448.
- Hartman BJ, Tomasz A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 158(2):513-516.

- Henderson DK. 2006. Managing methicillin-resistant staphylococci: A paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms. *Am J Infect Control*, 34(5 Suppl 1):46-54: discussion 64-73.
- Hennekinne JA, Kerouanton A, Brisabois A, De Buyser ML. 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Appl Microbiol*, 94(2):321-9.
- Herwaldt LA. 2003. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and surgical-site infections. *Surgery*, 134(5 Suppl):2-9.
- Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC, Blumberg HM, King MD. 2005. Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Patients Admitted to an Urban Hospital: Emergence of Community-Associated MRSA Nasal Carriage. *Clin Infect Dis*, 41(2):159-66.
- Higashide M, Kuroda M, Ohkawa S, Ohta T. 2006. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *Int J Antimicrob Agents*, 27(6):500-504.
- Hornberg C, Knoop D, Kipp F. 2006. Bedeutung von MRSA in der Patientenversorgung. *Orthopäde*, 35(11):1159-1168.
- HPA (Health Protection Agency). 2006. Surveillance of surgical site infection in England: October 1997 – September 2005. London, UK: Health Protection Agency.
http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/surgical_site_infection/all_97_05_SSI.pdf
(Zugriff 12.12.2007).
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26(11):2465-2466.
- IfSG (Infektionsschutzgesetz). Bundesministerium der Justiz. 2000. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen. <http://bundesrecht.juris.de/ifsg/>
(Zugriff 12.12.2007).

- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6):1449-1458.
- Jacobsson G, Dashti S, Wahlberg T, Andersson R. 2007. The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden. *Scand J Infect Dis*, 39(1):6-13.
- Janata O. 2005. Staphylokokken – heute ein Problem? *Antibiotikamonitor* 6. Jubiläumsheft Teil 2. http://www.antibiotikamonitor.at/05_6/05_6_02.htm (Zugriff 12.12.2007).
- Jarvis WR. Investigating endemic and epidemic nosocomial infections. 1998. In: Bennett JV, Brachman PS, Hrsg. *Hospital Infections*. 4. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven, 85-102.
- Jevons MP. 1961. „Celbenin“-resistant staphylococci. *Br Med J*, 1:124-125.
- Kahl BC, Mellmann A, Deiwick S, Peters G, Harmsen D. 2005. Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 43 (1):502-505.
- Kampf G, Kramer A. 2004. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev*, 17(4):863-893.
- Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. 2002. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 51(2):126-132.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*, 298(15):1803-4.

- Kloos WE. 1991. *Staphylococcus*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, Hrsg. Manual of Clinical Microbiology. 5th edition. Washington: American Society of Microbiology, 222-237.
- Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. 2004. *spa* Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. J Clin Microbiol, 42(2):792-799.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases, 6:130.
- Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novick RP. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science, 259(5092):227-230.
- Kresken M, Hafner D, and the Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. 1999. Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in Central Europe during 1975-95. Infection, 27(suppl. 2):2-8.
- Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA für die Studiengruppe PEG-Resistenzstudie. 2004. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/PEG-Resistenzstudie%202004.pdf (Zugriff 12.12.2007).
- Kresken M, Hafner D, Witte W, Reinert RR. 1999. Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen grampositiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum. Chemother J, 8:136-145.
- Kwok AY, Chow AW. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol, 53(Pt 1):87-92.
- Lang U, Boden K, Wagner A, Pfister W. 2007. Evaluation of *Staphylococcus aureus* screening in Thuringian University Hospital. [unveröffentlichte Arbeit]

- Lang U, Weisser H, Andreas C, Pfister W, Straube E. 2005b. Comparison of *spa* typing and PFGE results in a MRSA outbreak situation [Poster]. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin. Hamburg: P 97.
- Lang U, Andreas C, Weisser H, Wagner A, Pfister W, Straube E. 2005a. Experience with *spa* typing of clinical MRSA isolates in a thuringian university hospital [Poster]. 2nd Annual Conference of the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). Jena: Clin Chem Lab Med, 43(9):A105.
- Layer F, Ghebremedhin B, König W, König B. 2006. Heterogeneity of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains at a German University Hospital Implicates the Circulating-Strain Pool as a Potential Source of Emerging Methicillin-Resistant *S. aureus* Clones. J Clin Microbiol, 44(6):2179-2185.
- Lepelletier D. 2006. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: incidence, facteurs de risque de colonisation et intérêt du dépistage systématique en unité de soins intensifs et réanimation. Ann Fr Anesth Reanim, 25(6):626-632.
- Lindsay JA, Moore CE, Day NP, Peacock SJ, Witney AA, Stabler RA, Husain SE, Butcher PD, Hinds J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. J. Bacteriol, 188(2):669-676.
- Linhardt F, Ziebuhr W, Meyer P, Witte W, Hacker J. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiol Lett, 74(2-3):181-185.
- Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 111(9):1265-1273.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA, 95(6):3140-3145.

- Manzur A, Vidal M, Pujol M, Cisnal M, Hornero A, Masuet C, Peña C, Gudiol F, Ariza J. 2007. Predictive factors of meticillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infections at hospital admission. *Journal of Hospital Infection* 66(2):135-141.
- Marshall C, Wesselingh S, McDonald M, Spelman D. 2004. Control of endemic MRSA—what is the evidence? A personal view. *J Hosp Infect*, 56(4):253-268.
- Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. 1993. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: White TJ, Hrsg. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 563-572.
- Matushek MG, Bonten MJ, Hayden MK. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 34(10):2598-2600.
- Mc Dougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol*, (41):5113-5120.
- Melles DC, Gorkink RF, Boelens HA, Snijders SV, Peeters JK, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, van der Leeuwen WB, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. 2004. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Investig*, 114(12):1732-1740.
- Mellmann A, Friedrich AW, Kipp F, Hinder F, Keckevoet U, Harmsen D. 2005. Evidenzbasierte Hygienemaßnahmen mittels *spa*-Typisierung bei MRSA-Häufungen im Krankenhaus. *Dtsch Med Wochenschr*, 130(22):1364-1368.
- Mellmann A, Friedrich AW, Rosenkötter N, Rothgänger J, Karch H, Reintjes R, Harmsen D. 2006. Automated DNA Sequence-Based Early Warning System for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks. *PLoS Med*, 2006 3(3):e33.
- Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Rothgänger J, Sammeth M, Stoye J, Harmsen D. 2007. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on *spa* polymorphisms. *BMC Microbiol*, 7(1):98.

- Mikolajczyk RT, Sagel U, Bornemann R, Krämer A, Kretzschmar M. 2007. A statistical method for estimating the proportion of cases resulting from cross-transmission of multi-resistant pathogens in an intensive care unit. *J Hosp Infect*, 65(2):149-155.
- Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. 2002. Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 40(6):2119-2125.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262(4):56-65, 64-65.
- Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M. 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 39(10):3481-3485.
- Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn ME, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Coombes G, Cookson B. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol*, 41(4):1574-1585.
- Musser JM, Kapur V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from international sources: association of the *mec* gene with divergent, phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol*, 30(8):2058-2063.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM, SHEA. 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24(5):362-386.
- Neely AN, Maley MP. 2000. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. *J Clin Microbiol*, 38(2):724-726.

Newcombe RG. 1998. Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods. *Stat Med*, 17(8):857-872.

NINSS (Nosocomial Infection National Surveillance Service and Public Health Laboratory Service - Health Protection Agency). 2002. Surveillance of hospital-acquired bacteraemia in English hospitals 1997-2002.

http://www.hpa.org.uk/infections/publications/ninns/hosacq_HAB_2002.pdf (Zugriff 12.12.2007).

Nixon M, Jackson B, Varghese P, Jenkins D, Taylor G. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopaedic wards: incidence, spread, mortality, cost and control. *J Bone Joint Surg Br*, 88(6):812-7.

O'Brien FG, Udo EE, Grubb WB. 2006. Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis of *Staphylococcus aureus*. *Nat Protoc*, (6):3028-33.

Ogston A. 1882. *Micrococcus* poisoning. *J Anat*, 17:24-58.

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*, 40(11):4289-94.

Olive DM, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6):1661-1669.

Pantůček R, Götz F, Doškař J, Rosypal S. 1996. Genomic Variability of *Staphylococcus aureus* and the Other Coagulase-Positive *Staphylococcus* Species Estimated by Macrorestriction Analysis Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol*, 46(1):216-222.

PEG (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie). 2007. AG „Empfindlichkeitsprüfung und Resistenz“. http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm (Zugriff 12.12.2007).

- Personne P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun Y, Etienne J. 1997. Comparative Performances of Six Agglutination Kits Assessed by Using Typical and Atypical Strains of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 35(5):1138-1140.
- Peters G, Pulverer G, 2001. Die Familie der *Micrococcaceae*. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie. Achte Aufl. München; Jena: Gustav Fischer Verlag, 250-260.
- Peterson LR, Brossette SE. 2002. Hunting health care-associated infections from the clinical microbiology laboratory: Passive, active, and virtual surveillance. J Clin Microbiol, 40(1):1-4.
- Pittet D. 2001. Improving adherence to hand hygiene practice: a multidisciplinary approach. Emerg Infect Dis, 7(2):234-240.
- Potel C, Álvarez M, Álvarez P, Otero I, Fluiters E. 2007. Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals. Clin Microbiol Inf, 13(7): 728-30.
- Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol, 30(4):967-973.
- Ridom Spa-Server. <http://spaserver.ridom.de/> (Letzter Zugriff 12.12.2007).
- RKI (Robert-Koch-Institut). 2005. Bericht aus dem Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken. Epidemiol Bull 41. <http://www.rki.de> (Zugriff 12.12.2007).
- RKI (Robert-Koch-Institut). 2007a. Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. <http://www.rki.de/> (Zugriff 12.12.2007)
- RKI (Robert-Koch-Institut). 2007b. Zur MRSA-Situation in Deutschland 2005 und 2006. Situationsbericht aus dem Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken. Epidemiol Bull 6. <http://www.rki.de> (Zugriff 12.12.2007).

Robinson DA, Enright MC. 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 47(12):3926-3934.

Rudolf-Elle gGmbH Waldkrankenhaus Eisenberg/ Thüringen. 2004. Strukturierter Qualitätsbericht für der Berichtsjahr 2004.

www.krankenhaus-eisenberg.de/fileadmin/dokumente/Q_Bericht_2004.pdf (Zugriff 12.12.2007)

Ruppitsch W, Indra A, Stöger A, Mayer B, Stadlbauer S, Wewalka G, Allerberger F. 2006. Classifying *spa* Types in Complexes Improves Interpretation of Typing Results for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 44(7):2442-2448.

Safdar N, Maki DG. 2002. The commonality of risk factors for nosokomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. Ann Intern Med 136(11): 834-44.

Saiman L, Cronquist A, Wu F, Zhou J, Rubenstein D, Eisner W, Kreiswirth BN, Della-Latta P. 2003. An outbreak of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol, 24(5):317-321.

Schneewind O, Model P, Fischetti VA. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. Cell, 70(2):267-281.

Sexton T, Clarke P, O'Neill E, Dillane T, Humphreys H. 2006. Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. J Hosp Infect, 62(2):187-194.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol, (37):3556-3563.

Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, McGeer A, Paton S, Mulvey MR. 2002. Laboratory characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: results of 5 years of national surveillance, 1995–1999. J Infect Dis, 186(5):652-660.

- Singh A., Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. 2006. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev*, 19(3):512-530.
- Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsushashi M. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett*, 221(1):167-171.
- Strandén A, Frei R, Widmer AF. 2003. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR Replace Pulsed-Field Gel Electrophoresis? *J Clin Microbiol*, 41(7):3181-3186.
- Struelens MJ. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect*, 2(1):2-11.
- Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, and the CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*, 7(3):382-389.
- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, (32):407-415.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33(9):2233-2239.
- Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. 2001. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 7(2):327-332.
- Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, 34(5 Suppl 1):S3-10.
- Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*, 97(3):309-317.

- Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerg Infect Dis*, 10(9):1627-34.
- Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. 1984. Complete sequence of staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*, 259(3):1696-1702.
- Universitätsklinikum Jena. 2004. Qualitätsbericht 2004. Nach der Vereinbarung gemäß § 137 Abs. 1 Satz 3 Nr. 6 SGB V über Inhalt und Umfang eines strukturierten Qualitätsberichtes für nach § 108 SGB V zugelassene Krankenhäuser vom 03.12.2003. www.kliniken.de/qualitaetsberichte/download/07743-Jena-Klinikum-der-Friedrich-Schiller-261600736-01-2004.pdf (Zugriff 12.12.2007).
- Universitätsklinikum Jena. 2005. Erläuterung zum Hygieneplan Nr. 36/2005: Bekanntes und Neues zu MRSA.
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. 1998a. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2):275-293.
- van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brien F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. 1998b. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol*, 36(6):1653-1659.
- Vietri NJ, Dooley DP, Davis CE Jr, Longfield JN, Meier PA, Whelen AC. 2004. The effect of moving to a new hospital facility on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect Control*, 32(5):262-267.
- von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G Study Group. 2001. Nasal carriage as source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med*; 344(1):11-16.

Waldvogel FA. 2000. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In Principles and practice of infectious diseases. G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, Hrsg. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Churchill Livingstone, 2069-2092.

Walker J, Borrow R, Edwards-Jones V, Oppenheim BA, Fox AJ. 1998. Epidemiological characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in the North West of England by protein A (*spa*) and coagulase (*coa*) gen polymorphisms. Epidemiol Infect, 121(3):507-514.

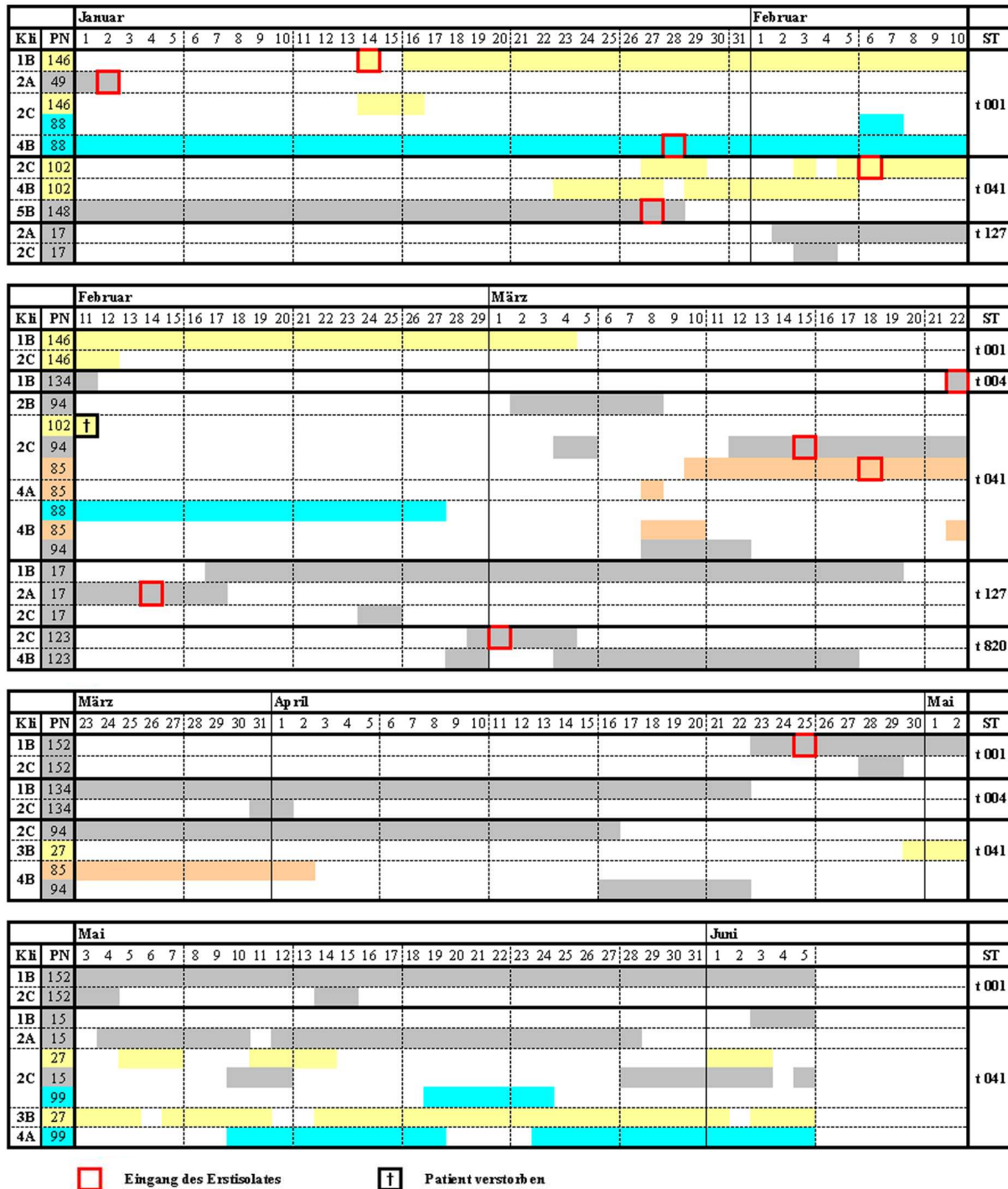
Witte W, Cuny C, Strommenger B, Bräulke C, Heuck D. 2004. Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Euro Surveill, 9(1):16-8.

Witte W, Mielke M. 2007. Community MRSA. Zentralbl Chir, 132(2):124-9.

10 Anhang

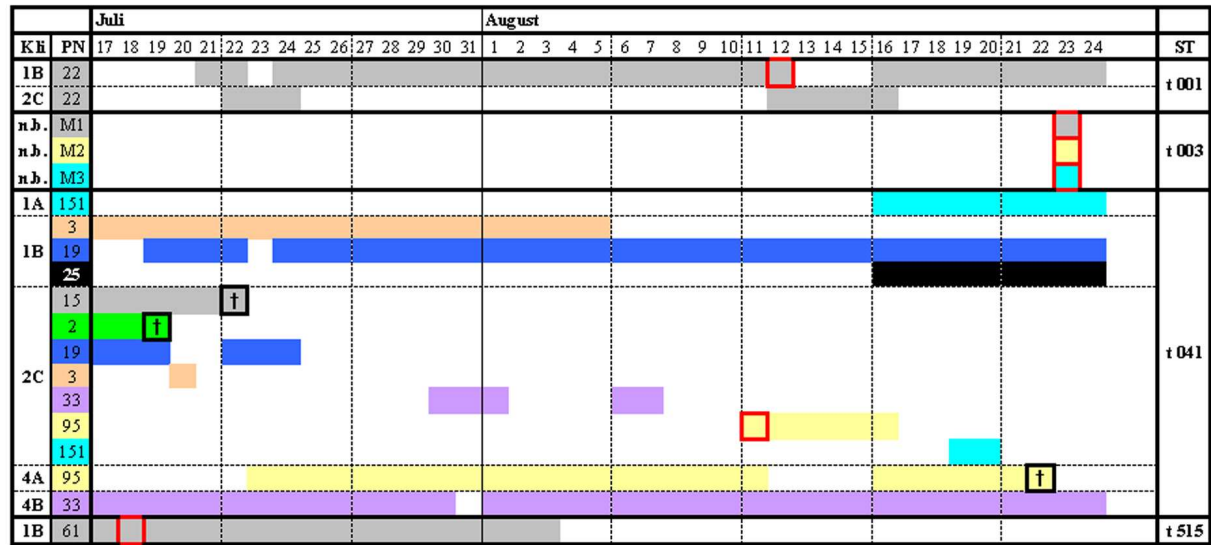
10.1 Gesamtübersicht der MRSA-Situation am Rudolf-Elle-Krankenhaus

Zur Interpretation der Ergebnisse wird der Leser auf Abschnitt 6.2.5 verwiesen. Abkürzungen: Kli = Klinische Abteilung, PN = Patientennummer, ST = *Spa*-Typ, n.b. = nicht bekannt.

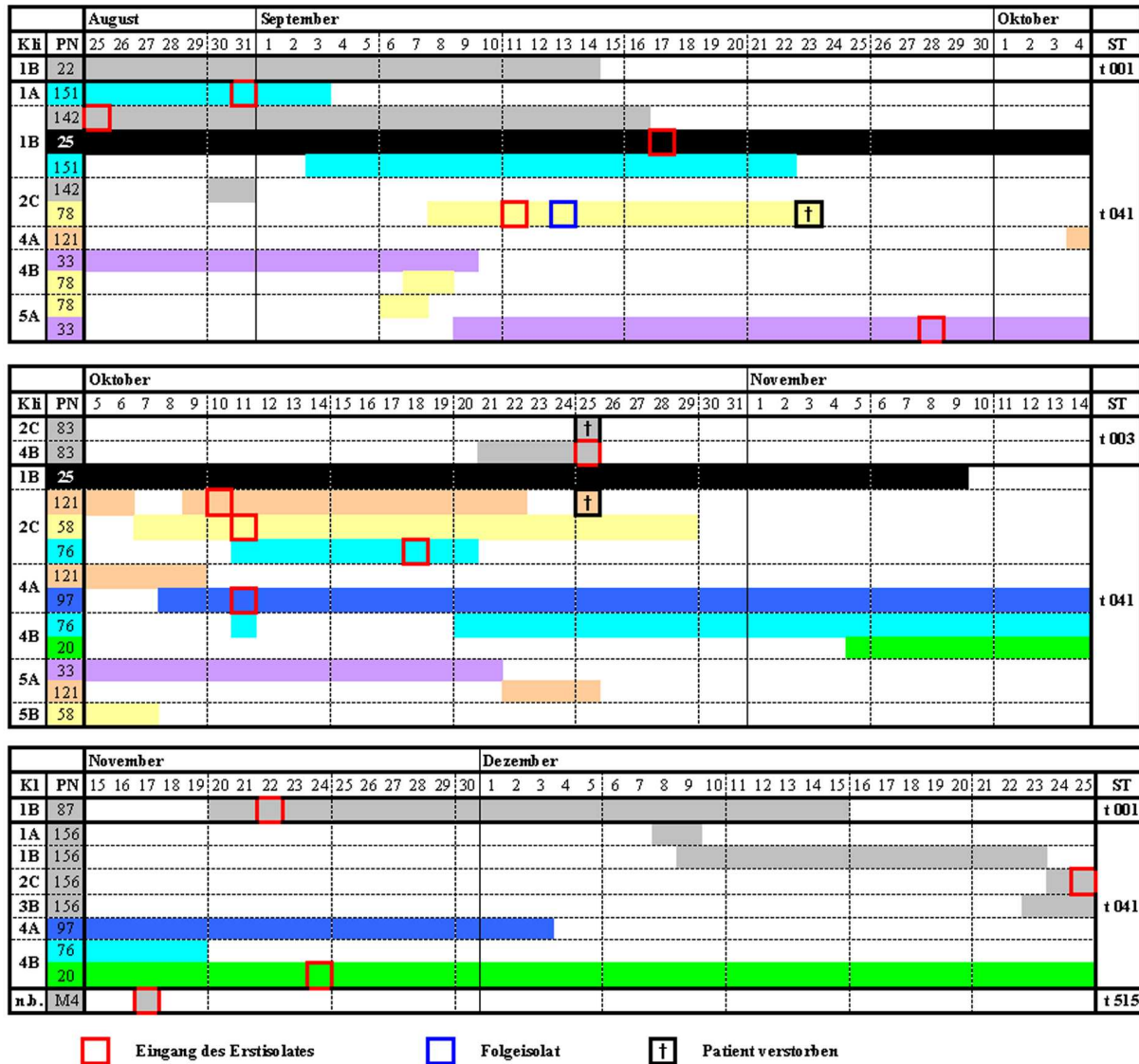


□ Eingang des Erstisolates

† Patient verstorben



☐ Eingang des Erstisolates ☐ Folgeisolat ☒ Patient verstorben



10.2 Gesamtübersicht der zu typisierenden Isolate

Nachfolgend findet sich die Gesamtübersicht aller typisierten Isolate. Die Patientendaten wurden alphabetisch geordnet und anschließend aufsteigend durch eine Patientennummer verschlüsselt.

Tab. 22: Zusammenstellung der zu typisierenden Isolate. LN = Labornummer, GD = Geburtsdatum, En = Entnahme, Ei = Eingangsdatum 2004, ST = Spa-Typ, Kl = Einsende Klinik, PN = Patientennummer. H1-H4 = Hygieneisolate (H1: Hand, H2: Dusche, H3: Hand, H4: Kugelschreiber), M1-M4 = Mitarbeiterisolate. Keine *S. aureus*: PN 70 = *S. haemolyticus* (*S. h.*), PN 38, 67, 106 = *S. saprophyticus* (*S. s.*). Entnahmeart: As = Aszites, Bal = Bronchiallavage, Bk = Blutkultur, BLK = Blasenkatheter, BRS = Bürste Bronchialabstrich, Ha = Hautabstrich, Kath = Katheter, Naab = Nasenabstrich, PP = Pleurapunktat, R = Rodac-Platte, Raab = Rachenabstrich, So = Sonstige, Spu = Sputum, Stu = Stuhl, T = Tupfer, Tra = Trachealsekret, Ur = Urin, Vagi = Vaginalabstrich, Wa = Wundabstrich, WK = Kopfwundenabstrich. Einsende Klinik: AN = Anästhesie, CA = Allgemeinchirurgie, CH = Chirurgie, CHZ = Zahnklinik, CN = Neurochirurgie, CT = Thoraxchirurgie, CU = Unfallchirurgie, D = Dermatologie, FA = Gynäkologie, GM = Gerichtsmedizin, HNO = Hals-Nasen-Ohrenklinik, Kin = Kinderklinik, M = Innere Medizin, MK = Knochenmarkstransplantationszentrum, N = Neurologie, Patho = Pathologie, Psy = Psychiatrie, RK = Rudolf-Elle-Krankenhaus, U = Urologie.

LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN	LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN
Bk 00401	10.1.19	Bk	14.1	t 003	Psy	42	Va 11488	7.8.40	Wa	28.6	t 032	CA	79
Bk 04125	28.2.23	Bk	8.4	t 003	CU	118	Va 11538	3.10.38	Wa	28.6	t 032	M	86
BK 06180-1	8.10.31	Bk	30.5	t 041	M	51	Va 11807-2	25.4.26	Tra	1.7	t 002	M	1
Bk 06436	1.12.28	Bk	6.6	t 041	RK	99	Va 11818-3	17.11.45	Raab	1.7	t 041	RK	2
Bk 06980	7.8.40	Bk	23.6	t 032	CA	79	Va 11879-1	20.1.29	Tra	2.7	t 001	N	104
Bk 07704-2	9.11.50	Bk	12.7	t 003	M	7	Va 11883	22.3.28	Wa	2.7	t 001	U	9
Bk 08914	16.11.50	Bk	10.8	t 004	CH	129	Va 11994	3.5.58	BLK	5.7	t 041	AN	143
Bk 09106	8.10.31	Bk	13.8	t 041	M	51	Va 12041	7.4.30	Ha	5.7	t 004	D	100
Bk 10185	5.4.32	Bk	7.9	t 001	AN	82	Va 12209-1	21.5.32	Ha	7.7	t 003	N	153
Bk 10730	13.12.64	Bk	22.9	t 041	AN	46	Va 12410	23.4.57	Naab	9.7	t 001	AN	89
Bk 10840	28.3.86	Bk	24.9	t 003	MK	140	Va 12623-1	3.10.38	Wa	12.7	t 032	M	86
Bk 13745	16.2.38	Bk	6.12	t 003	CU	77	Va 12623-3	3.10.38	Wa	12.7	t 032	M	86
Hy 00566		T	27.1	tx374	AN	H1	Va 12637-1	7.4.30	Ha	12.7	t 004	D	100
Hy 01780-3		R	23.3	t 003	U	H2	Va 12698	9.11.50	Naab	13.7	t 003	M	7
Hy 06782		R	16.11	t 003	CH	H3	Va 12778-1	3.6.20	Bal	14.7	t 003	AN	14
Hy 06783		R	16.11	t 003	CH	H4	Va 12782-1	31.8.40	Raab	14.7	t 041	RK	19
Mr 00053	12.8.34	Wa	26.10	t 040	M	114	Va 12782-2	31.8.40	Raab	14.7	t 041	RK	19
Mr 00101	29.4.59	Naab	30.10	t 032	M	137	Va 12919-1	24.5.37	Wa	15.7	t 004	M	128
Mr 00221	29.4.32	Wa	12.11	t 535	CH	21	Va 12919-2	24.5.37	Wa	15.7	t 004	M	128
Mr 00228	17.7.42	WK	12.11	t 003	CHZ	90	Va 13079	20.11.28	Wa	18.7	t 515	RK	61
Mr 00233-1	7.5.29	BRS	12.11	t 001	M	145	Va 13095-1	9.2.31	Raab	18.7	t 041	AN	66
Mr 00233-2	7.5.29	BRS	12.11	t 001	M	145	Va 13528	20.7.29	Wa	23.7	t 001	CA	8
Mr 00273	27.8.59	Naab	17.11	t 515	RK	M4	Va 13540	5.11.63	Tra	23.7	t 041	CN	13
Mr 00591	29.10.40	Ha	10.12	t 003	M	44	Va 13736	7.8.22	Ha	26.7	t 032	M	133
Mr 00627	5.11.49	Raab	14.12	t 004	N	138	Va 13765-2	8.10.31	Wa	27.7	t 041	M	51

LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN	LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN
Mr 00632-1	10.3.30	Naab	14.12	t 003	M	147	Va 13987-1	17.7.42	Wk	27.7	t 003	MK	90
Mr 00632-2	10.3.30	Naab	14.12	t 003	M	147	Va 14702-2	7.5.44	As	9.8	t 515	CH	101
Mr 00693	29.10.25	So	20.12	t 004	M	34	Va 14788-1	12.5.66	Kath	10.8	t 032	AN	30
Mr 00716	26.4.38	Wa	27.12	t 032	CH	69	Va 14937-1	25.3.29	Tra	11.8	t 041	RK	95
Mr 00817	3.6.46	Wa	27.12	t 032	CH	91	Va 15011	5.3.24	Wa	12.8	t 001	RK	22
St 00023-3	12.1.68	Stu	2.1	t 001	RK	49	Va 15199	13.12.64	Wa	16.8	t 041	AN	46
St 02610	25.2.42	Stu	30.6	t 001	AN	24	Va 15355	23.3.32	Ha	18.8	t 003	D	40
St 03742-4	28.3.86	Stu	9.9	t 003	MK	140	Va 15589-1	16.11.50	Wa	22.8	t 004	CH	129
St 05162	26.7.54	Stu	29.11	t 003	M	112	Va 15589-2	16.11.50	Wa	22.8	t 004	CH	129
Ur 02849-2	22.6.14	Ur	16.3	t 004	U	75	Va 15674	3.11.68	Bal	23.8	t 041	AN	68
Ur 03112	12.8.34	Ur	22.3	t 040	M	114	Va 15710-1	6.3.69	Naab	23.8	t 003	RK	M2
Ur 03687-2	26.5.30	Ur	7.4	t 003	U	107	Va 15711-1	24.5.65	Naab	23.8	t 003	RK	M3
Ur 06883-1	28.11.30	Ur	30.6	t 003	U	5	Va 15720-2	23.11.76	Naab	23.8	t 003	RK	M1
Ur 07134-2	4.11.36	Ur	7.7	t 003	U	80	Va 15753-1	2.3.48	Bal	24.8	t 032	AN	29
Ur 08929-1	28.11.30	Ur	19.8	t 003	U	5	Va 15924-1	30.6.31	Wa	25.8	t 041	RK	142
Ur 10216	28.11.30	Ur	21.9	t 003	U	5	Va 16041-2	19.4.34	Wa	27.8	t 003	M	132
Va 0005-1	5.8.36	Wa	1.1	t 004	CA	81	Va 16105-3	27.5.41	Ha	28.8	<i>S. h.</i>	AN	70
Va 00085-1	27.7.32	Wa	2.1	t 004	CT	122	Va 16349	3.7.54	Wa	31.8	t 041	RK	151
Va 00085-2	27.7.32	Wa	2.1	t 004	CT	122	Va 16583	27.5.41	Ha	3.9	<i>S. h.</i>	M	70
Va 00427-3	24.2.37	Wa	8.1	t 003	M	10	Va 16699	2.3.48	Bal	6.9	t 032	M	29
Va 00632-3	21.2.17	Naab	12.1	t 004	CH	131	Va 16734-1	5.4.32	Kath	6.9	t 001	AN	82
Va 00718-1	20.5.49	Naab	13.1	t 113	M	113	Va 17148	2.1.30	Wa	11.9	t 041	RK	78
Va 00852	22.5.23	Wa	14.1	t 001	RK	146	Va 17239	2.1.30	Wa	13.9	t 041	RK	78
Va 01452-1	16.12.36	Bal	24.1	t 001	AN	120	Va 17252-1	5.11.63	Bal	13.9	t 041	M	13
Va 01492-1	25.7.27	Tra	25.1	tx374	AN	130	Va 17252-2	5.11.63	Bal	13.9	t 041	M	13
Va 01597	9.1.22	Kath	27.1	t 041	RK	148	Va 17394-2	12.12.48	Wa	14.9	t 041	CH	60
Va 01760	24.7.20	Wa	28.1	t 001	RK	88	Va 17417-2	11.6.30	Wa	14.9	t 041	CA	26
Va 01776	3.5.50	Ha	28.1	<i>S. s.</i>	AN	106	Va 17500-3	18.10.36	Naab	15.9	t 001	CN	31
Va 01816	27.4.43	Ha	29.1	<i>S. s.</i>	AN	38	Va 17542	6.1.28	Wa	16.9	t 041	CU	155
Va 01822	22.1.78	Ha	29.1	<i>S. s.</i>	CU	67	Va 17606-3	2.3.48	Bal	16.9	t 032	M	29
Va 02238	13.1.68	Raab	3.2	t 294	CU	45	Va 17713-1	18.3.48	Wa	17.9	t 041	RK	25
Va 02462	26.1.28	Naab	6.2	t 041	RK	102	Va 18200-2	14.10.36	Wa	24.9	t 032	MK	136
Va 02956	17.5.55	Wa	14.2	t 127	RK	17	Va 18333-2	24.4.32	Kath	27.9	t 535	CH	21
Va 03130	23.2.28	Tra	17.2	t 007	AN	11	Va 18435-1	28.3.86	Kath	28.9	t 003	MK	140
Va 03199	31.8.48	Wa	17.2	t 003	D	103	Va 18435-2	28.3.86	Kath	28.9	t 003	MK	140
Va 03208	13.11.81	Wk	17.2	t 002	HNO	74	Va 18435-3	28.3.86	Kath	28.9	t 003	MK	140
Va 03609	7.6.30	Wa	23.2	t 001	AN	125	Va 18468-1	7.5.24	Spu	28.9	t 001	M	145
Va 04000	16.12.36	Wa	28.2	t 001	AN	120	Va 18508-2	19.4.22	Wa	28.9	t 041	RK	33
Va 04008	19.9.34	Bal	28.2	t 001	AN	127	Va 18579	10.8.26	Kath	29.9	t 041	Path	48
Va 04126-2	10.3.28	Naab	1.3	t 820	RK	123	Va 18741-1	11.6.81	Spu	1.10	t 003	Kin	149
Va 04192	11.6.81	Spu	2.3	t 003	Kin	149	Va 18910-6	12.5.56	Raab	4.10	t 001	M	126
Va 04342	15.1.63	Tra	4.3	t 001	HNO	157	Va 19247-1	16.9.41	Wa	8.10	t 032	AN	39
Va 04565-1	19.9.34	Tra	8.3	t 001	AN	127	Va 19307	1.1.30	Bal	10.10	t 041	RK	121
Va 04565-2	19.9.34	Tra	8.3	t 001	AN	127	Va 19328-1	21.8.42	Wa	10.10	t3264	CU	110
Va 04669-1	9.7.55	Naab	9.3	t 001	HNO	124	Va 19357-1	25.8.40	Tra	11.10	t 041	RK	58

LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN	LN	GD	En	Ei	ST	Kl	PN
Va 04912-2	4.10.38	Tra	12.3	t 001	M	92	Va 19387-1	11.5.29	Wa	11.10	t 041	M	63
Va 05010-5	8.10.40	Wa	15.3	t 041	CH	98	Va 19408-1	23.10.48	Wa	11.10	t 041	RK	97
Va 05038-2	16.3.30	Naab	15.3	t 041	RK	94	Va 19446	11.6.81	Spu	12.10	t 003	Kin	149
Va 05238	19.3.80	Raab	17.3	t 003	Kin	71	Va 19491-1	10.1.36	Wa	12.10	t 004	CH	23
Va 05350-1	19.7.79	Raab	18.3	t 041	RK	85	Va 19693	11.5.29	Wa	14.10	t 041	CH	63
Va 05631	25.10.27	Wa	22.3	t 004	RK	134	Va 19734-1	21.5.35	Bal	15.10	t 032	M	12
Va 05894-2	29.11.14	Wa	25.3	t 001	GM	32	Va 19887-1	6.7.42	Tra	18.10	t 041	RK	76
Va 05894-3	29.11.14	Wa	25.3	t 001	GM	32	Va 20264	15.1.29	Wa	21.10	t 037	D	96
Va 06496-1	5.11.68	Wk	4.4	t 032	CN	144	Va 20303	31.12.66	Ha	22.10	t 1194	D	62
Va 06695	18.5.39	Bal	7.4	t 001	AN	135	Va 20316	25.12.23	Wa	22.10	t 003	CHZ	139
Va 06769	26.5.30	Wa	7.4	t 003	U	107	Va 20343	24.2.37	Wa	22.10	t 003	M	10
Va 07156	20.8.20	Tra	15.4	t 001	N	4	Va 20493	15.5.16	Tra	25.10	t 003	RK	83
Va 07253-1	10.7.33	Wa	16.4	t 004	D	54	Va 20628-1	22.4.32	Naab	27.10	t 003	M	141
Va 07555-4	27.4.15	Vagi	21.4	t 001	FA	16	Va 20873	20.2.39	Wa	29.10	t 041	CU	115
Va 07720	8.12.19	Wa	25.4	t 001	RK	152	Va 21156	12.11.45	Wa	3.11	t 041	D	28
Va 09329	7.12.57	Tra	21.5	t 001	HNO	52	Va 21287	24.1.30	Wa	5.11	t 041	M	47
Va 09692-1	6.9.44	Wk	27.5	t 003	HNO	72	Va 21393	12.10.30	Tra	8.11	t 041	N	35
Va 09776-1	13.9.19	Wa	28.5	t 001	CH	109	Va 21632-2	19.4.33	PP	11.11	t 003	CH	154
Va 09788-1	19.8.79	Bal	29.5	t 003	N	64	Va 21867	21.6.55	Wa	16.11	t 003	CN	50
Va 10068	15.2.28	Tra	3.6	t 003	N	117	Va 22027	3.8.29	Kath	18.11	t 003	AN	53
Va 10127	25.2.42	Wa	5.6	t 001	AN	24	Va 22285-1	20.10.38	Wa	22.11	t 001	RK	87
Va 10613	3.10.38	Spu	14.6	t 032	M	86	Va 22364-1	17.6.39	Wa	23.11	t 003	FA	105
Va 10723	9.12.48	Wa	15.6	t 041	RK	3	Va 22457-1	9.6.51	Wa	24.11	t 041	RK	20
Va 10895-1	3.10.38	Bal	18.6	t 032	M	86	Va 22525-1	5.4.38	Wa	26.11	t 003	CH	119
Va 10895-2	3.10.38	Bal	18.6	t 032	M	86	Va 22528-1	19.4.34	Wa	26.11	t 003	CA	132
Va 10899	12.12.39	Bal	18.6	t 032	M	84	Va 22896-1	17.7.28	Kath	3.12	t 041	CU	150
Va 10939	19.5.23	Raab	18.6	t 041	RK	27	Va 22896-2	17.7.28	Kath	3.12	t 041	CU	150
Va 10970	27.7.34	Tra	19.6	t 001	AN	36	Va 23009	4.10.59	Ha	5.12	t 004	D	59
Va 11031	2.5.21	Naab	21.6	t 041	RK	15	Va 23489-3	21.9.45	Wa	14.12	t 004	CH	56
Va 11137	21.4.27	Tra	22.6	t 041	AN	57	Va 23501	6.6.24	Wa	14.12	t 001	M	93
Va 11282-3	31.12.39	Tra	24.6	t 041	RK	43	Va 23675-1	27.4.82	Spu	17.12	t 481	CH	6
Va 11308	3.4.76	Naab	24.6	t 008	M	73	Va 23717	4.5.45	Bal	18.12	t 040	AN	41
Va 11309	3.4.76	Naab	24.6	t 008	M	73	Va 23737	18.8.33	Tra	19.12	t 004	N	108
Va 11310	6.6.32	Ha	24.6	t 885	D	111	Va 23943	25.2.32	Wa	22.12	t 004	D	18
Va 11376	9.9.64	Kath	25.6	t 688	U	116	Va 24091	3.3.41	Wa	25.12	t 041	RK	156
Va 11420	31.12.39	PP	26.6	t 041	RK	43	Va 24357-3	7.8.40	Spu	30.12	t 032	M	79
Va 11466	18.10.36	Tra	27.6	t 001	N	31	Va 24371-3	25.12.36	Kath	30.12	t 004	N	55

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Prof. Dr. med. E. Straube, Prof. Dr. med. W. Pfister, Dr. med. U. Lang, Dr. med. K. Boden,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Themen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 11.01.2008

Christian Andreas

Danksagung

Nachfolgend möchte ich all jenen danken, die mich bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. E. Straube danke ich für die Vergabe und Begleitung des Promotionsthemas sowie die Bereitstellung sämtlicher hierfür erforderlicher Ressourcen am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena. Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. U. Lang für seine hervorragende Betreuung, Unterstützung und nicht zuletzt unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen Phasen meines Schaffens. Gleichsam möchte ich mich auch ausdrücklich bei Frau Dr. med. K. Boden und Herrn Prof. Dr. med. W. Pfister bedanken, welche mir während der Ausformulierung des schriftlichen Teils dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Frau S. Stoll möchte ich Dank sagen für die freundliche Hilfe bei praktischen Arbeiten sowie sämtlichen Fragen rund ums Labor. Gleiches gilt für Frau H. Kräplin, welche mir insbesondere bei der Probenaufarbeitung ihre wertvolle Zeit opferte. Außerdem gilt auch weiteren Beteiligten, vor allem Frau S. Sachse und Frau G. Gaschler Dank für die ständige Hilfe und freundschaftliche Zusammenarbeit. In diesem Sinne möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena für die herzliche Aufnahme und stetes Entgegenkommen danken.

Herrn Dr. med. R. Vollandt, Herrn Dr. med. A. Wagner sowie Herrn Dr. med. F. Wolfram gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung bezüglich Datenerfassung und -auswertung. Des Weiteren danke ich meinen lieben Freunden Maria Gampe, Thomas Schäffer, Thomas Schmidt und Jörg Grünewald für anregende Diskussionen und Verbesserungsvorschläge im Rahmen der Auswertung und Strukturierung meiner Promotion. Für die ununterbrochene Aufmunterung und geistige Ablenkung in schwierigen Phasen dieser Arbeit möchte ich mich zudem bei Isabell Wolowski bedanken.

Besonderen Dank schulde ich nicht zuletzt auch meinen Eltern, die mich stets motiviert haben, und ohne die mein Medizinstudium und somit diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

- **Persönliche Daten**

Name: Christian Andreas

Geburtsdatum: 28.02.1982

Anschrift: Rosmarinstrasse 20, D-09117 Chemnitz

- **Schulausbildung**

1988-1992 Grundschulausbildung an der Flemmingschule, Chemnitz

1992-2000 Gymnasiale Oberstufe am Georgius-Agricola-Gymnasium, Chemnitz

2000 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

- **Hochschulausbildung**

2001 Beginn des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

2003 Abschluss des Grundstudiums (Physikum)

2006/07 Praktisches Jahr:

1. Tertial: Innere Medizin, Hôpital de Haute-pierre, Strasbourg, Frankreich

2. Tertial: HNO, Kantonsspital Luzern, Schweiz

3. Tertial: Chirurgie, 1. Hälfte Helios-Klinikum-Erfurt, 2. Hälfte Charles S. Curtis Memorial Hospital, St. Anthony, Kanada

2008 Abschluss des Hauptstudiums (Staatsexamen)

- **Wissenschaftliche Arbeiten**

Lang U, Weisser H, Andreas C, Pfister W, Straube E. 2005. Comparison of *spa* typing and PFGE results in a MRSA outbreak situation [Poster]. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin. Hamburg: P 97.

Lang U, Andreas C, Weisser H, Wagner A, Pfister W, Straube E. 2005. Experience with *spa* typing of clinical MRSA isolates in a thuringian university hospital [Poster]. 2nd Annual Conference of the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). Jena: Clin Chem Lab Med, 43(9):A105.